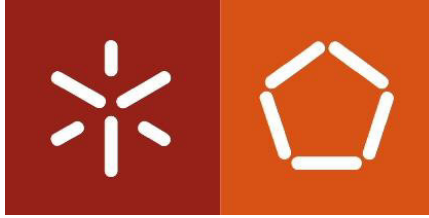


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Rui Manuel dos Santos Nunes

**Investigação da produção do ácido
itaconíco pela bactéria *Escherichia
coli***



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Rui Manuel dos Santos Nunes

**Investigação da produção do ácido
itacónico pela bactéria *Escherichia
coli***

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação da

Doutora Sónia Madalena Azevedo Carneiro

e co-orientação da

**Professora Doutora Isabel Cristina de Almeida Pereira
da Rocha**

Outubro 2013

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS
DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE
COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura:_____

Agradecimentos

Chegado este momento, gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído com sucesso, nomeadamente:

À minha orientadora, Doutora Sónia Carneiro, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo deste trabalho, assim como pelas correcções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Gostaria também de agradecer a Professora Isabel Rocha pela ajuda e interesse que demonstrou ao longo deste trabalho.

Agradeço à Engenheira Madalena Vieira por toda a disponibilidade e ajuda prestada.

Ao Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, na pessoa do Professor Eugénio Ferreira e da Professora Isabel Belo, gostaria de agradecer as condições disponibilizadas.

A todos os que estão ou que passaram por este Laboratório, pela amizade, apoio e pelo excelente ambiente de trabalho.

À Adelaide Braga, uma grande Amiga, pelos momentos partilhados, pelas sugestões, entusiasmo e pela disponibilidade demonstrada nos momentos mais difíceis.

Não posso deixar de agradecer à Patrícia Ferreira por toda a disponibilidade e ajuda manifestada, pelo valioso apoio no HPLC e pela amizade estabelecida.

À Daniela Correia por toda a disponibilidade e apoio sempre que precisei.

Aos meus colegas e amigos do grupo “Ganir”, principalmente à Diana Vilas Boas, ao Mário Sousa, ao Pedro Silva, à Elisabete Fernandes, à Elísia Lopes e à Alexandra Azevedo, pelas horas de divertimento.

À Debora Ferreira uma palavra especial, pelo apoio, compreensão e paciência que sempre teve comigo.

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram.

Por fim gostaria de agradecer ao meu clube do coração, o C.C.R. Raimonda ao qual já faço parte há mais de 10 anos e a todas as pessoas que estão ou passaram neste clube, pela compreensão e pelos momentos de brincadeira.

Resumo

O ácido itacónico (AI) é um ácido carboxílico que apresenta elevado potencial para ser usado como monómero na síntese de diversos materiais sintéticos. Actualmente, é produzido por fermentação com fungos filamentosos, obtendo-se rendimentos mais elevados em comparação com outras espécies, nomeadamente bacterianas. Entre as diversas espécies de fungos, o *Aspergillus terreus* e o *Aspergillus niger* são as que apresentam melhores níveis de produção deste ácido ($> 80\text{g.L}^{-1}$). No entanto, em comparação com o processo de produção de ácido cítrico ($> 200\text{g.L}^{-1}$) utilizando estes mesmos fungos, a produtividade é consideravelmente mais baixa. Existe por isso a necessidade de um desenvolvimento contínuo de novas tecnologias de fermentação e a procura de novas estirpes produtoras, incluindo organismos geneticamente modificados, de modo a melhorar o processo biológico.

O AI é sintetizado através da atividade catalítica da *cis*-aconitato descarboxilase (CAD), cujo gene pode ser isolado de uma vasta gama de fungos filamentosos. A sua clonagem em organismos hospedeiros, como as bactérias, possibilita a produção de AI usando plataformas microbianas com melhores características para a implementação industrial, essencialmente no que respeita às condições operacionais. A abordagem deste trabalho parte do facto da *Escherichia coli* ser actualmente reconhecida como uma das plataformas microbianas adequadas à produção recombinante de diversos produtos, incluindo ácidos orgânicos tais como o AI.

O efeito do AI na fisiologia e no metabolismo da *E. coli* em cultura com diferentes substratos foi inicialmente testado. Os resultados apontam que o AI não deverá ser usado como fonte de carbono pela *E. coli*, facto que poderia afectar a produtividade final do processo, mas afecta o crescimento celular da *E. coli* quando se usam fontes de carbono gluconeogénicas, nomeadamente acetato. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de produção de uma estirpe de *E. coli* recombinante BL21(DE3) pET52-CAD com o gene CAD de *A. terreus*. Nestes ensaios foram testadas apenas as condições de pH do meio fermentativo, dado ser um dos factores mais relevantes na produção de AI. Os resultados mostram que a gama de pH testada não terá efeito na produção de AI, mas afecta a formação de biomassa. Os níveis de produção obtidos ($0,034\text{g.L}^{-1}$) estão ainda muito abaixo de outros processos de produção (80g.L^{-1} em *A. terreus*). Embora os resultados de produção sejam pouco promissores, deve ter-se em conta a necessidade de testar outras condições fermentativas para avaliar a produção óptima de AI em *E. coli*. Para além disso, existe a possibilidade de manipulação da *E. coli* por meio de estratégias de engenharia metabólica, que abre novas expectativas relativamente à optimização deste processo.

Abstract

Itaconic acid (IA) is a carboxylic acid with a high potential to be used as a monomer in the synthesis of various materials. Currently, IA is produced by fermentation using filamentous fungi, providing high product yields compared to other microorganisms, particularly bacteria. Among the fungal species, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger* present the best production levels ($> 80\text{g.L}^{-1}$), but titers are still lower compared to the production of citric acid with fungi ($>200\text{ g.L}^{-1}$). Therefore, there is a need for a continuous development of new fermentation technologies and the search for new strains, including genetically modified strains to enhance the production of IA.

The IA is synthesized through the enzymatic activity of *cis*-aconitate decarboxylase (CAD), whose gene can be isolated from a wide range of filamentous fungi, but preferentially from *A. terreus*. Cloning the CAD gene in host organisms, like *E. coli*, allows the production of IA by organisms that present more favorable properties for the industrial production, mainly with regards to operating conditions and costs associated with the industrial process.

The purpose of this work relies on the fact that *E. coli* has been recognized as a well-established platform for the microbial production of various recombinant products, including organic acids and, as such, may also be interesting for the production of IA at the industrial-scale. Thus, the investigation of the IA effects on the physiology of *E. coli* cells grown at different conditions (i.e., carbon sources) was prioritized, so that we could understand the most favorable conditions for the production of IA in *E. coli*. The results pointed out that IA may not be used as a carbon source, a fact that would affect the final yield of the process, but limits cell growth when using gluconeogenic carbon sources. Then, a recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pET52-CAD strain with the CAD gene from *A. terreus* was used to evaluate the production of IA. In these assays, different pH conditions were tested, which revealed no effects on the production of IA at the range of pH values tested. Although the recombinant activity of CAD was not affected, the cell growth was; which indicates the potential activation of cellular mechanisms, perhaps to maintain the intracellular pH that affect cellular growth. The production levels obtained (0.034 g.L^{-1}) were still much lower compared with other production process (for example 80g.L^{-1} in *A. terreus*), but metabolic engineering strategies opens new promising perspectives for the optimization of this process.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XV
CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO	XVII
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O ÁCIDO ITACÔNICO (AI) E AS SUAS APLICAÇÕES	3
1.1.1. <i>Produção de AI: síntese química versus biotecnológica</i>	4
1.2. VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS À BIOSÍNTESE DE AI	5
1.3. POTENCIAIS PLATAFORMAS MICROBIANAS NA PRODUÇÃO DE AI	8
1.4. BIOPROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE AI	13
1.4.1. <i>Processos de fermentação descontínua (ou em batch)</i>	13
1.4.2. <i>Processos de fermentação contínua (ou em quimiostato)</i>	13
1.4.3. <i>Influência de parâmetros fisiológicos na produção de AI</i>	14
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. FERMENTAÇÕES	19
2.1.1. <i>Estirpes</i>	19
2.1.2. <i>Meios de cultura</i>	19
2.1.3. <i>Preparação do inóculo</i>	21
2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
2.2.1. <i>Determinação da concentração de biomassa</i>	21
2.2.2. <i>Determinação da concentração de glucose</i>	22
2.2.3. <i>Determinação da concentração de metabolitos extracelulares</i>	22
2.3. ENSAIOS DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO	24
2.3.1. <i>Efeito da presença de AI no meio de cultura</i>	24

2.3.2. Determinação do efeito do AI nos parâmetros fisiológicos.....	27
2.3.3. Avaliação da produção de AI em <i>E. coli</i> recombinante e o efeito do pH	29
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. EFEITO DO AI NO METABOLISMO DA <i>E. COLI</i> /W3110	33
3.1.1. Determinação do Efeito do AI nos Parâmetros Fisiológicos.....	35
3.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AI EM <i>E. COLI</i> /RECOMBINANTE E O EFEITO DO PH	39
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	45
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFIA.....	49
CAPÍTULO 6: ANEXOS.....	61
A.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	59
A.1.1. Curvas de calibração da biomassa	59
A.1.2. Curva de calibração do Kit enzimático.....	59
A.1.3. Curva de calibração do HPLC.....	60
A.2. INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL EM BIORREATOR	62
A.3. DADOS UTILIZADOS AO LONGO DO TRABALHO.....	63
A.3.1. Curvas de crescimento referente á experiencia 1	63
A.3.1.1. Concentração de substrato.....	67
A.3.2. Acumulação de subprodutos referente á experiência 2.....	68

Capítulo 1: Introdução

FIGURA 1.1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO ITACÓNICO (AI).....	3
FIGURA 1.2 - ESQUEMA METABÓLICO PARA A BIOSÍNTESE DE AI EM <i>A. TERREUS</i> (ADAPTADO DE KLEMENT & BÜCHS, 2013).....	6
FIGURA 1.3 - VIAS PROPOSTAS PARA A BIOSÍNTESE DO AI (BONNARME <i>ET AL.</i> , 1995). A) O PIRUVATO É INCORPORADO NO CICLO DO TCA E O AI É PRODUZIDO POR DESCARBOXILAÇÃO DO <i>CIS</i> ACONITATO CATALISADA PELA ENZIMA CAD; B) CONDENSAÇÃO DE PIRUVATO E ACETIL-CoA A CITRAMALATO, QUE SERÁ DESIDRATADO A AI; C) CONDENSAÇÃO DE TRÊS MOLÉCULAS DE ACETIL-CoA FORMANDO 1,2,3-TRICARBOXYPROPANOATO E SUBSEQUENTEMENTE AI.....	7
FIGURA 1.4- METABOLISMO DA GLUCOSE E DO ACETATO EM <i>E. COLI</i> (ADAPTADO DE PHUE <i>ET AL.</i> , 2005; SHILOACH & RINAS, 2009), (A) GLICÓLISE E GLUCONEOGÉNESE, (B) FORMAÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE ACETATO, (C) CICLO TCA E (D) VIA GLIOXILATO.	12

Capítulo 2: Materiais e Métodos

FIGURA 2.1- ENSAIOS DE CRESCIMENTO COM <i>E.COLI</i> W3110 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E CONCENTRAÇÕES DE AI. AO CONTROLO NÃO FOI ADICIONADA QUALQUER FONTE DE CARBONO. FOI USADO UM MESMO INÓCULO PARA INOCULAR OS DIFERENTES MATRAZES DE MODO A INICIAR-SE COM A MESMA DENSIDADE CELULAR (CERCA DE UMA DO DE 0,2).....	25
FIGURA 2.2 - FOTOGRAFIA DA INCUBADORA ORBITAL E RESPECTIVA INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL.....	26

Capítulo 3: Resultados e Discussão

FIGURA 3.1 – CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>E. COLI</i> /W3110, EM MODO FED-BATCH COM DIFERENTES SUBSTRATOS (GLUCOSE E ACETATO). ESTANDO REPRESENTADO TAMBÉM O PONTO AO QUAL FOI ADICIONADO 0,1 g.L ⁻¹ DE AI	36
FIGURA 3.2 - CURVAS DE CRESCIMENTO, DE SUBSTRATO E DE PRODUTO. A) E B) PH 6,2; C) E D) PH 6,5; E) E F) PH 7. PARA AS TRÊS FERMENTAÇÕES FOI ADICIONADO 0.75 mM IPTG, LOGO APÓS AS 5 HORAS DE CULTIVO.	41

FIGURA 3.3- ACUMULAÇÃO DE CITRATO E SUCCINATO AO LONGO DAS FERMENTAÇÕES COM DIFERENTES PHs. A SETA INDICA O PONTO DA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA CAD E CONSEQUENTE ACTIVIDADE COM A ADIÇÃO DE IPTG (0,75 mM).....	43
---	----

Capítulo 6: Anexos

FIGURA A.1 - EXPRESSÃO DA RETA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA. A) <i>E. COLI</i> W3110; B) <i>E. COLI</i> BL21(DE3)-CAD.	59
FIGURA A. 2 - EXPRESSÃO DA RETA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE.	60
FIGURA A.3 - EXPRESSÃO DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO DO HPLC, PARA CADA COMPOSTO ANALISADO. A) ÁCIDO ITACÔNICO; B) ACETATO; C) PROPIONATE.....	61
FIGURA A. 4- FOTOGRAFIA DA INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL DO BIORREATOR.	62
FIGURA A.5 - CURVAS DE CRESCIMENTO E RESPETIVOS ERROS PADRÃO. M1 (MEIO M9+ 0 g.L ⁻¹ AI), M2 (MEIO M9 + 0,1 g.L ⁻¹ AI), M3 (MEIO M9 + 1g.L ⁻¹ AI), M4 (MEIO M9 + 0g.L ⁻¹ AI + GLUCOSE), M5 (MEIO M9 + 0,1g.L ⁻¹ AI + GLUCOSE) E M6 (MEIO M9 + 1g.L ⁻¹ AI + GLUCOSE).....	63
FIGURA A.6 – CURVAS DE CRESCIMENTO E RESPETIVOS ERROS PADRÃO. M1 (MEIO M9 + 0 g.L ⁻¹ AI), M7 (MEIO M9 + 0 g.L ⁻¹ AI + ACETATO) E M10 (MEIO M9 + 0g.L ⁻¹ AI + PROPIONATO)	64
FIGURA A.7- CURVAS DE CRESCIMENTO E RESPETIVOS ERROS PADRÃO. M2 (MEIO M9 + 0,1 g.L ⁻¹ AI), M8 (MEIO M9 + 0,1 g.L ⁻¹ AI + ACETATO) E M11 (MEIO M9 + 0,1 g.L ⁻¹ AI + PROPIONATO)	65
FIGURA A.8 - CURVAS DE CRESCIMENTO E RESPETIVOS ERROS PADRÃO. M3 (MEIO M9 + 1 g.L ⁻¹ AI), M9 (MEIO M9 + 1 g.L ⁻¹ AI + ACETATO) E M12 (MEIO M9 + 1g.L ⁻¹ AI + PROPIONATO)	66
FIGURA A.9 - QUANTIFICAÇÃO POR GC-MS, DE CITRATO E SUCCINATO AO LONGO DO TEMPO, NAS CULTURAS AERÓBICAS EM MODO <i>FED-BATCH</i> . A) E C) GLUCOSE COMO FONTE DE CARBONO; B) E D) ACETATO COMO FONTE DE CARBONO.	68

Capítulo 1: Introdução

TABELA 1. 1 – LISTA DE PRODUTORES NATURAIS DE AI.....	9
TABELA 1. 2 - MICRORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA A PRODUÇÃO DE AI.....	10

Capítulo 2: Materiais e Métodos

TABELA 2. 1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SINTÉTICO M9 MODIFICADO.....	20
TABELA 2. 2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE TRAÇOS MINERAIS.	20
TABELA 2. 3 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS.....	21
TABELA 2. 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO PARA AS FERMENTAÇÕES <i>FED/BATCH</i>	28

Capítulo 3: Resultados e Discussão

TABELA 3.1 - EFEITO DO AI NOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DA <i>E. COLI</i> W3110 A $\text{pH} \approx 7$ E A 37°C EM MEIO M9, USANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO. NOS ENSAIOS DE CONTROLO NÃO FOI ADICIONADA QUALQUER FONTE DE CARBONO, MAS PROCEDEU-SE À ADIÇÃO DE AI COMO NOS RESTANTES MATRAZES. OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, NOMEADAMENTE A TAXA DE CRESCIMENTO (μ) E RENDIMENTO EM BIOMASSA ($Y_{X/S}$) FORAM DETERMINADOS NA FASE EXPONENCIAL. AS CONCENTRAÇÕES DE AI CORRESPONDEM APENAS AO PONTO INICIAL E FINAL DAS CULTURAS.	34
TABELA 3.2 - PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DA <i>E. COLI</i> W3110 EM CULTURAS AERÓBICAS EM MODO <i>FED-BATCH</i> , COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO. AS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO ADICIONADAS CORRESPONDEM A UMA MESMA CONCENTRAÇÃO MOLAR EM BASE DE CARBONO DE $5.1 \text{ C-MOL.KG}^{-1}$. O AI FOI ADICIONADO COM UMA CONCENTRAÇÃO DE $0,1 \text{ G.L}^{-1}$ QUANDO A CULTURA ATINGIU UMA $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ DE APROXIMADAMENTE 7 EM GLUCOSE E 5 EM ACETATO.....	37
TABELA 3.3 – TAXA DE ACUMULAÇÃO DE CITRATO E SUCCINATO NO MEIO DE CULTURA DAS FERMENTAÇÕES EM <i>FED-BATCH</i> . OS METABOLITOS EXTRACELULARES FORAM MEDIDOS POR GC-MS.	38
TABELA 3.4 - EFEITO DO PH SOBRE O CRESCIMENTO DA <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) PET52-CAD E CONSEQUENTE PRODUÇÃO DE AI.....	42

Capítulo 6: Anexos

TABELA A.1 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS NA FERMENTAÇÃO EM GLUCOSE.	67
TABELA A.2 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS NA FERMENTAÇÃO EM ACETATO.	67
TABELA A.3 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS NA FERMENTAÇÃO EM PROPIONATE.	67

Lista de Símbolos

$A_{600\text{nm}}$	Absorvância a 600 nanómetros (nm)
AI	Ácido itacónico
ALR	Reator Air-Lift
CAD	Cis-Aconitato Descarboxilase
DCU	Digital Control Unit
DO	Densidade ótica (nm)
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS).
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
ICL	Isocitrate Lyase
q_s	Taxa Específica de Consumo de Substrato
rpm	Rotações por Minuto
STR	Reator de Tanque Agitado
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
V_{vm}	Volume de ar por Volume do reactor por Minuto
μ	Taxa Específica de Crescimento
X	Biomassa
$Y_{x/s}$	Rendimento em Biomassa

Contextualização e Motivação

Neste capítulo são apresentadas a contextualização do estudo e a motivação subjacente ao tema do trabalho, bem como os objectivos específicos deste trabalho.

A aplicação de microrganismos e/ou os seus componentes em processos industriais (ou processos biológicos) para a biossíntese de compostos químicos tem sido amplamente explorada como uma alternativa à síntese “puramente” química. A utilização de processos biológicos para a produção de matérias-primas com elevado interesse industrial e económico tornou-se nos últimos tempos uma prioridade nalguns sectores industriais, seguindo as recomendações de programas internacionais, tais como “The Biomass Program” do Departamento de Energia dos Estados Unidos da América (Bull *et al.*, 2000).

Os bioprocessos podem ser descritos como processos nos quais uma população pura ou mista de microrganismos é capaz de converter vários substratos em energia e biomassa e frequentemente noutros subprodutos ou metabolitos de interesse (Lee, 1996; Wang *et al.*, 2009; Zawada e Swartz, 2005; Doran, 2013). A utilização de microrganismos capazes de produzir este tipo de produtos a baixo custo e com uma elevada produtividade, tornou-se uma das ferramentas mais importantes, tanto na indústria química como na indústria alimentar e farmacêutica. Contudo, a produção sustentável destes produtos continua a depender do desenvolvimento de novas estratégias que permitam melhorar as capacidades fisiológicas dos organismos usados, bem como do desenvolvimento tecnológico para o aumento da produtividade destes bioprocessos (Harms *et al.*, 2002; Zawada e Swartz, 2005).

Hoje em dia, a produção de ácidos orgânicos é vista como um valioso contributo à obtenção de produtos químicos mais versáteis para a indústria química e alimentar. Por isso, a investigação da produção microbiana de ácidos orgânicos tem vindo a ganhar cada vez maior relevância. Porém, para alcançar uma sustentabilidade económica, ecológica e social é essencial que as matérias-primas utilizadas não venham a competir directamente com a cadeia de abastecimento alimentar. Assim, é premente a utilização de substratos não-comestíveis de plantas, como por exemplo, materiais lignocelulósicos, a matéria-prima mais abundante no planeta (B. Kamm e M. Kamm, 2007; Klement e Büchs, 2013) e/ou subprodutos de outras indústrias que possam ser usadas por estes microrganismos.

O AI (ácido itacónico), assim como outros ácidos orgânicos, tem sido obtido através de processos fermentativos usando diversos organismos, desde fungos a bactérias (Carvalho *et al.*, 2005). Originalmente a sua produção era feita através da destilação pirolítica de ácido cítrico, mas com a descoberta de uma estirpe de *A. terreus* capaz de produzir AI (Kinoshita, 1931) revolucionou a forma de produção deste ácido orgânico. Em 1955, a produção industrial de AI passou a ser feita por fermentação submersa com *A. terreus* implementada inicialmente pela Pfizer Co. Inc. nos EUA

(Pfeifer *et al.*, 1952; Luskin, 1974) e mais tarde, por outras unidades industriais na Inglaterra, França, Rússia e Japão. Embora o processo completo para a produção Al utilizando a estirpe *A. terreus* tenha sido estabelecido apenas nos anos 60, por Kobayashi & Nakamura (1966) e Kobayashi (1967), a produção industrial deste composto tem sido explorado desde a sua descoberta por Kinoshita (1931).

Após mais de meio século desde as primeiras implementações, a produção industrial de Al continua a ser feita primordialmente por processos fermentativos em *batch* com *A. terreus* (Yahiro *et al.*, 1997). No entanto, as circunstâncias económicas e ambientais em torno da produção de Al mudaram drasticamente nos últimos tempos, devido à crescente preocupação com a sustentabilidade e os custos energéticos. O desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação e processos biológicos mais sofisticados oferecem um novo interesse no estudo da produção Al. Entre elas, a utilização de novas fontes de carbono, ou então a utilização de diferentes estirpes geneticamente modificadas com a inserção de novas actividades catalíticas, tais como a aconitate decarboxilase codificada pelo gene CAD do *A. terreus*.

Entre as várias plataformas microbianas existentes, a *E. coli* é uma das mais utilizadas para a produção deste tipo de compostos químicos, dado ser um dos microrganismos mais estudados e utilizados para a produção de diversos produtos, além de apresentar um rápido crescimento em substratos de baixo custo, tornando os processos produtivos mais rentáveis. Existem actualmente alguns casos de sucesso na aplicação de estirpes de *E. coli* geneticamente modificadas para a produção de ácidos orgânicos, nomeadamente na produção de ácido láctico usando uma estirpe mutante ($\Delta frdABCD$, $\Delta adhE$, $\Delta pfkB$, e $\Delta ackA$) derivada da *E. coli* W3110 (Zhou *et al.*, 2003) e na produção de xilonato usando uma estirpe mutante (pA-xdh, pA-xylC e pA-xdhxylC.) derivada da *E. coli* BL21star(DE3) (Cao *et al.*, 2013).

Tendo em conta os avanços na engenharia metabólica e o potencial económico da produção deste composto na indústria, foi explorada a possibilidade de implementar um novo processo de produção de Al em *E. coli*. Os principais objetivos deste trabalho foram:

- (I) Explorar a capacidade de usar a *E. coli* como plataforma microbiana para a produção de Al;
- (II) Entender o efeito da produção de Al no metabolismo da *E. coli*;
- (III) E por fim, avaliar a produção de Al em processos fermentativos com uma *E. coli* recombinante através da expressão heteróloga da enzima CAD de *A. terreus*.

Para tal, foram avaliados diversos parâmetros fisiológicos, nomeadamente rendimentos e taxas específicas de crescimento, assim como o estado metabólico das culturas através de análises do exometaboloma.

Capítulo 1: Introdução

Neste capítulo serão abordados conceitos básicos relativos à biossíntese de AI e a sua produção à escala industrial, assim como as potenciais aplicações desta matéria-prima. Explora-se ainda o interesse da utilização da *E. coli* neste trabalho, detalhando as principais potencialidades desta plataforma microbiana na produção de compostos orgânicos relevantes para a indústria, nomeadamente o AI.

- 1.1 O Acido Itacónico (AI) e as suas aplicações
 - 1.2 Vias metabólicas associadas à biossíntese de AI
 - 1.3 Potenciais plataformas microbianas na produção de AI
 - 1.4 Bioprocessos para a produção de AI
-

1.1. O Ácido Itacónico (AI) e as suas aplicações

O AI, devido à sua estrutura e propriedades físico-químicas, tornou-se uma das substâncias mais utilizadas na indústria, sendo atualmente considerada uma das 12 matérias-primas com maior interesse para produção por via biotecnológica (Willke & Vorlop, 2001).

Este ácido carboxílico, também conhecido por ácido succínico de metileno, tem a fórmula química $C_5H_6O_4$ e massa molar de $130,1 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 1.1) e é obtido normalmente por síntese química ou por fermentação microbiana usando diversas fontes de carbono, como por exemplo a glucose (Gyamerah, 1995; MuralidharaRao *et al.*, 2007; Tate, 1981).

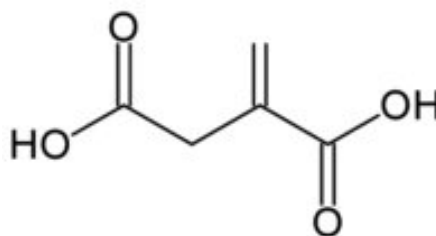


Figura 1.1 - Fórmula estrutural do Ácido Itacónico (AI).

Anualmente são produzidas mais de oitenta mil toneladas de AI em todo o mundo (Okabe *et al.*, 2009). Embora o preço do AI tenha vindo a baixar, de US\$ 4,3 dólares (Willke & Vorlop, 2001) para US\$ 2 dólares por quilograma (Okabe *et al.*, 2009), o seu mercado continua em expansão, exigindo uma constante inovação nos processos de produção, nomeadamente dos bioprocessos.

O AI pode ser usado na indústria como um monómero para a síntese de diversos materiais sintéticos, tais como resinas, detergentes, poliésteres, plásticos, vidro ou ainda na preparação de compostos bioativos para a agricultura, indústria farmacêutica e em alguns setores da medicina, tornando-se uma substância muito promissora a nível industrial (MuralidharaRao *et al.*, 2007; Okabe *et al.*, 2009; Willke & Vorlop, 2001).

Uma das aplicações mais importantes do AI é na síntese de polímeros, sendo considerado uma alternativa interessante às matérias-primas existentes. Por exemplo, o ácido *poli(itacónico)*, tem sido utilizado em inúmeras aplicações, incluindo como agentes superabsorventes em tratamentos de água, detergentes e dispersantes (Klement & Büchs, 2013; Willke & Vorlop, 2001). Além disso, o AI tem sido usado na síntese de co-polímeros usados como aditivos de cimento, na tecnologia de fibra de carbono, revestimentos de resina e borracha. Recentemente, foi ainda

demonstrado que o Al poderia atuar como um precursor de várias fontes potenciais de biocombustíveis, como o *3-metiltetrahidrofurano* (Geilen *et al.*, 2010). Na indústria têxtil, o Al é aplicado como ligante químico de tecido. A partir dos anos 90, as aplicações do Al foram estendidas para as áreas biomédicas, como a medicina dentária, oftalmologia e *drug delivery* (De *et al*/2004, Stanojevic *et al*/2006).

1.1.1. Produção de Al: síntese química *versus* biotecnológica

A síntese química de Al foi inicialmente feita através da pirólise de ácido cítrico e hidrólise de anidridos deste mesmo ácido (Luskin, 1974). No entanto, nenhum dos processos químicos descritos provou ser tão eficaz como a produção biotecnológica deste ácido utilizando fungos, nomeadamente o *A. terreus* (Tate, 1981). Embora o *A. terreus* seja actualmente o mais usado para a produção industrial de Al, foram feitas várias tentativas para encontrar outros sistemas biológicos adequados à produção deste ácido. Os primeiros desenvolvimentos na síntese biotecnológica do Al surgiram após ter sido detectada pela primeira vez a sua presença no meio de crescimento de um fungo, o *Aspergillus itaconicus* (Kinoshita, 1931). Mais tarde, outras estirpes fúngicas, principalmente do género *Aspergillus*, foram identificadas como produtoras naturais de Al apresentando elevados níveis de produção (Willke & Vorlop, 2001). Entre os fungos filamentosos, algumas espécies de *Ustilaginales* (Guevarra & Tabuchi, 1990) são também conhecidas como estirpes produtoras de Al. Algumas estirpes mutantes de *Candida* (Tabuchi *et al.*, 1981) foram também descritas como produtoras de Al.

O mercado do ácido itacónico tem vindo a crescer rapidamente. As propriedades deste ácido ampliam as suas potenciais aplicações, favorecendo a utilização na síntese de polímeros, entre outras aplicações na indústria química, farmacêutica e agricultura. No entanto, os custos de produção do Al continuam a ser um dos maiores obstáculos à sua aplicação. Várias tentativas têm sido feitas com o intuito de reduzir os seus custos de produção, tais como a utilização de substratos de baixo custo ou a utilização de biocatalisadores imobilizados em polímeros biocompatíveis. Esta última alternativa pode reduzir consideravelmente o custo do processo de produção, uma vez que permite a utilização repetida dos biocatalisadores evitando a perda de viabilidade das células por perturbações no processo (Magnuson & Lasure, 2004; Okabe *et al.*, 2009). Além disso, a seleção e a composição do meio de cultura é também um aspeto importante na optimização do processo de fermentação. Uma grande variedade de substratos tem sido

utilizada para a produção fermentativa de ácido itacónico. As melhores fontes de carbono são os açúcares, tais como o açúcar de cana e de beterraba, a maltose de amido hidrolisado e a sacarose, sendo os últimos os mais utilizados actualmente na produção comercial e, em menor grau, álcoois derivados de açúcar (Bonnarme *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 2009; Willke & Vorlop, 2001).

O processo utilizado pela Pfizer Inc., que envolve um processo de fermentação submersa utilizando células livres de *A. terreus* em melaço pré-tratado, é apresentado como um dos mais produtivos (Nübel & Ratajak, 1964). No entanto, a taxa de produção de AI não excede os 1 g.L⁻¹.h⁻¹, sendo obtidas concentrações de produto na ordem dos 80 g.L⁻¹. A implementação de novas abordagens, tais como a selecção de novas estirpes por técnicas de genotipagem, técnicas de engenharia genética e até imobilização celular, podem ser utilizadas para aumentar a produtividade do processo. Além disso, o uso de substratos alternativos pode reduzir o custo de produção. Entre as várias fontes de carbono disponíveis, o amido de milho é uma das melhores, uma vez que é muito puro e barato, podendo apresentar valores de rendimento de 0,35 g.g⁻¹ de substrato gasto por AI produzido (Magnuson & Lasure, 2004; Okabe *et al.*, 2009; Willke & Vorlop, 2001). A escolha da estirpe, condições de cultura e, em especial, a do modo fermentativo (*batch* ou contínuo) desempenham um papel importante no desenvolvimento de um processo industrial eficiente para a produção de AI (Willke & Vorlop, 2001).

1.2. Vias metabólicas associadas à biossíntese de AI

A biossíntese do AI foi inicialmente investigada por Kinoshita (1931), que propôs como a principal via de síntese a conversão de açúcares a piruvato através da glicólise e a oxidação do piruvato até *cis*-aconitato no ciclo do ácido tricarboxílico (ou ciclo de *Krebs*). Conforme ilustrado na Figura 1.2, o *cis*-aconitato será o precursor mais provável na biossíntese do AI, formado a partir da condensação da acetil-CoA e do oxaloacetato para formar citrato e posterior desidratação a *cis*-aconitato. A enzima responsável pela síntese de AI é designada por *cis*-aconitato descarboxilase, também referida como CAD, que catalisa a descarboxilação enzimática do ácido *cis*-aconitato a AI (Bentley & Thiessen, 1957b; Li *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Steiger *et al.*, 2013).

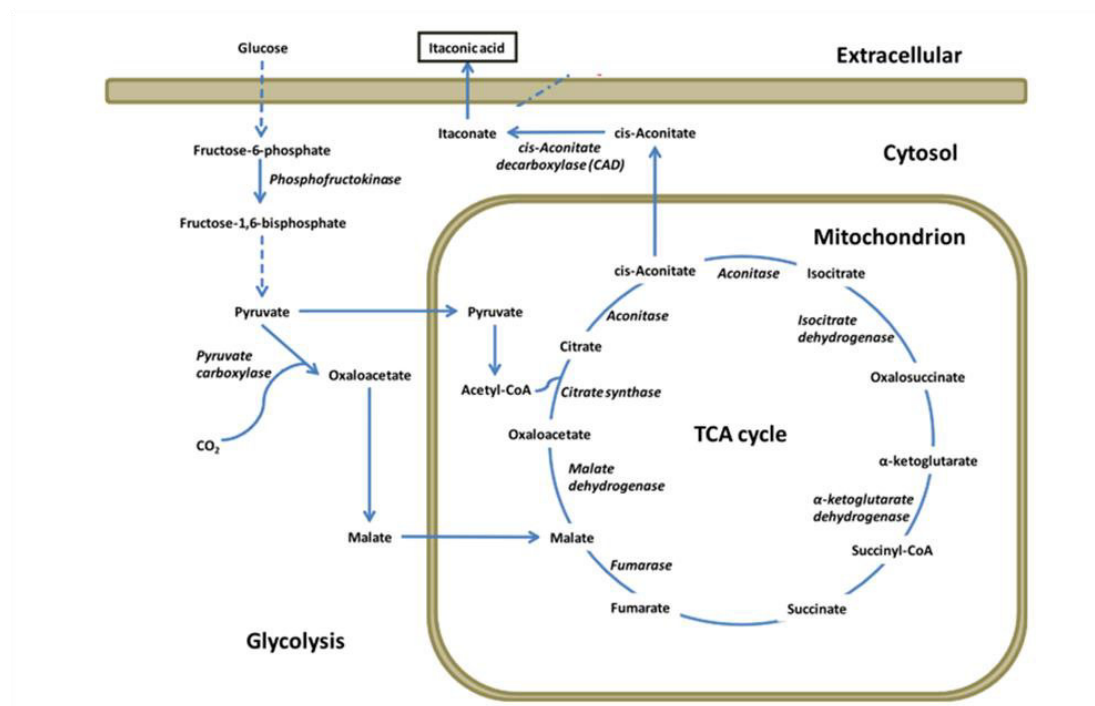


Figura 1.2 - Esquema metabólico para a biossíntese de AI em *A. terreus* (Adaptado de Klement & Büchs, 2013).

Porém, a via metabólica de produção do AI ainda não se encontra totalmente definida, e durante várias décadas, este foi um dos pontos fulcrais na investigação sobre a produção biotecnológica de AI. Em 1931, Kinoshita sugeriu a descarboxilação do *cis*-aconitato, sintetizado a partir da desidratação de ácido cítrico, como a reacção chave na via biossintética (Kinoshita, 1931). No entanto, contrariamente ao observado por Kinoshita, outros investigadores não detectaram a presença de ácido cítrico aquando da produção de AI em *A. terreus*, sugerindo que este pode não ser o único intermediário na síntese de AI (Calam *et al.*, 1939). Em 1957, estudos de Bentley e Thiessen mostraram fortes indícios da presença da enzima CAD em extratos de células de *A. terreus* (Bentley & Thiessen, 1957a,b,c), que poderiam catalisar a reacção de produção do AI. Para além disso, observaram que o ácido cítrico era um bom precursor para a produção de AI. Todavia, na década de 90, Jaklitsch e Bonnarme (Jaklitsch *et al.*, 1991; Bonnarme *et al.*, 1995) voltaram a sugerir a hipótese de haver várias vias de biossíntese e investigaram três vias metabólicas alternativas a partir de piruvato (ver Figura 1.3):

- Na primeira via (já descrita atrás), o piruvato é incorporado no ciclo do TCA e o AI é produzido por descarboxilação do *cis*-aconitato catalisada pela enzima CAD.
- A segunda via considera a condensação de piruvato e acetil-CoA a citramalato, que será

desidratado a AI (esta última reacção nunca foi identificada).

- c) A terceira possibilidade, considera a condensação de três moléculas de acetil-CoA formando 1,2,3-tricarboxypropanoato, que deverá ser oxidado para formar *cis*-aconitato que é subseqüentemente descarbóxilado a AI.

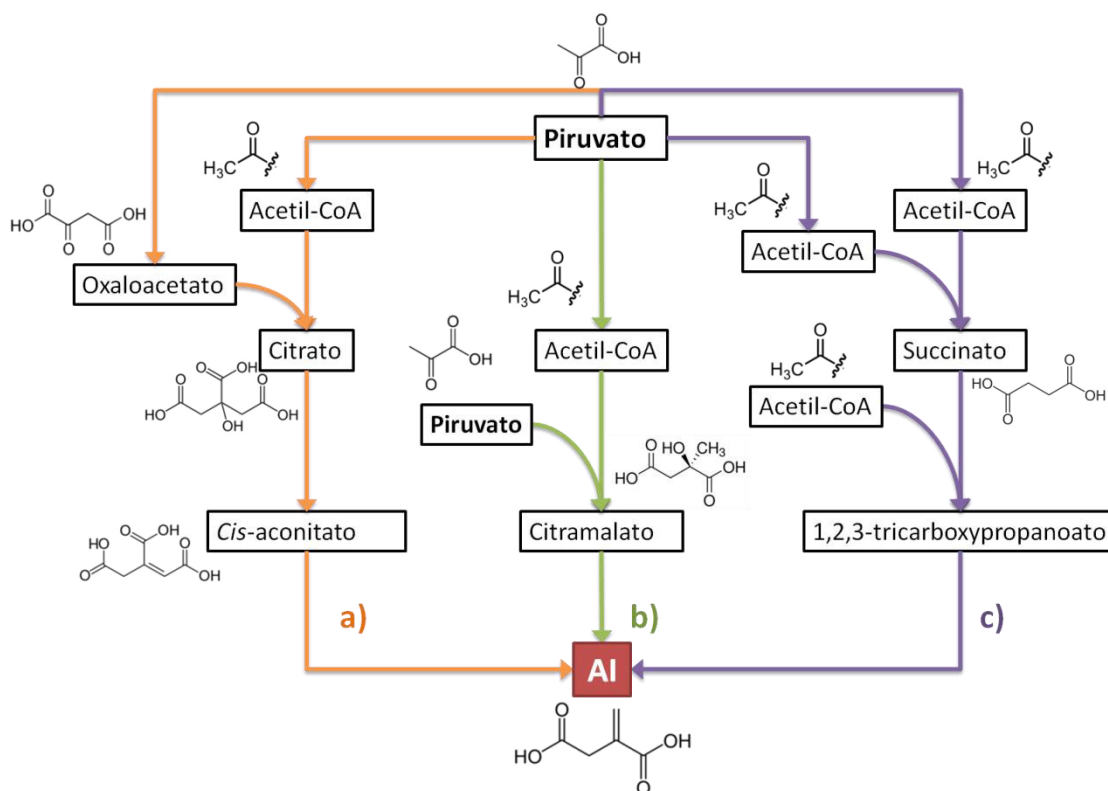


Figura 1.3 - Vias propostas para a biossíntese do AI (Bonname *et al.*, 1995). a) O piruvato é incorporado no ciclo do TCA e o AI é produzido por descarboxilação do *cis*-aconitato catalisada pela enzima CAD; b) Condensação de piruvato e acetil-CoA a citramalato, que será desidratado a AI; c) Condensação de três moléculas de acetil-CoA formando 1,2,3-tricarboxypropanoato e subseqüentemente AI.

Ambos os estudos (Jaklitsch *et al.*, 1991; Bonname *et al.*, 1995) chegaram à conclusão que a via (a) será a mais provável. Um dos passos mais importantes para a compreensão da biossíntese do AI, foi o isolamento e caracterização da enzima CAD (Dwiarti *et al.*, 2002). Em 2008, o gene CAD de *A. terreus* (identificado como ATEG_09971 ou *cad1*) foi finalmente identificado (Kanamasa *et al.*, 2008) e clonado em *Saccharomyces cerevisiae*, podendo demonstrar-se que esta enzima é a responsável pela produção do AI (Kanamasa *et al.*, 2008). No entanto, a regulação da síntese AI não é ainda totalmente compreendida. Bentley e Thiessen (1957c) demonstraram que a desactivação da enzima isocitrato desidrogenase com ferrocianeto de potássio beneficia a produção de AI. Isto sugere que perturbações na actividade do TCA possam

promover a acumulação de Al.

Relativamente à enzima CAD, demonstrou-se que estirpes com elevada capacidade de produção de Al têm normalmente níveis de expressão elevados para o gene que codifica a enzima CAD (Kanamasa *et al.*, 2008). Embora elevadas concentrações de Al possam inibir a sua própria produção, tanto em *A. terreus* (Yahiro *et al.*, 1995) como em *U. maydis* (Klement & Büchs, 2013), foi observado que o nível de expressão da enzima CAD permanece inalterado na presença de Al (Kanamasa *et al.*, 2008), sugerindo uma inibição pelo produto e não uma regulação da expressão do gene que a codifica. Aparentemente, esta pode ser uma enzima com expressão constitutiva, ou seja a expressão do gene codificante não é regulada, sendo a sua actividade promovida pelo desbalanceamento das actividades catalíticas associadas ao TCA.

A atividade da enzima foi recentemente investigada através da expressão heteróloga em *S. cerevisiae* (Steiger *et al.*, 2013), identificando-se o seu tamanho molecular (55 Kda) e as condições catalíticas óptimas: pH aproximadamente 6,2 e temperatura de 37°C. Nestas condições, a enzima apresenta valores de K_m de 2,45 mM. Estes parâmetros apontam para processos catalíticos favoráveis em condições de cultura com diversos organismos, incluindo a *E. coli*, embora o seu pH intracelular se mantenha entre os 7.2 e 7.8. Embora outros factores tenham que ser considerados na avaliação da melhor plataforma microbiana, as condições óptimas de temperatura e pH sugerem uma maior amplitude na escolha de plataformas microbianas, que vai para além dos fungos normalmente usados.

1.3. Potenciais plataformas microbianas na produção de Al

Embora o *A. terreus* seja ainda o microrganismo mais utilizado na produção de Al, têm sido feitas várias tentativas para encontrar outros microrganismos com níveis de produção superiores (ou semelhantes, desde que mais adequados às condições fermentativas e de recuperação do produto final) (Kuenz *et al.*, 2012; MuralidharaRao *et al.*, 2007).

Entre os fungos filamentosos, algumas espécies de *Ustilaginales* também são capazes de produzir elevados níveis de Al. Porém, os fungos filamentosos apresentam dificuldades de crescimento em biorreatores, nomeadamente na homogeneização da biomassa. Como alternativa aos fungos filamentosos, outros microrganismos têm sido investigados quanto à sua capacidade natural de produzir Al, entre eles, a *Pseudozyma antarctica* (Levinson *et al.*, 2006). Embora os primeiros resultados obtidos com estes microrganismos não filamentosos pareçam promissores, os

rendimentos e as concentrações finais em comparação com as estirpes industriais de *A. terreus*, são pouco interessantes. Na Tabela 1.1 são apresentados alguns desses valores de produção para os vários produtores naturais de AI.

Tabela 1. 1 – Lista de produtores naturais de AI.

Microrganismo	Concentração de AI (g.L ⁻¹)	Referências bibliográficas
<i>Aspergillus terreus</i> (desenvolvimento inicial)	24-27	(Kane <i>et al.</i> , 1945)
<i>Aspergillus terreus</i> (processo otimizado)	≈80	(Kuenz <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ustilago maydis</i>	53	(Guevarra & Tabuchi, 1990)
<i>Candida sp.</i>	35	(Tabuchi <i>et al.</i> , 1981)
<i>Pseudozyma antarctica</i>	30	(Levinson <i>et al.</i> , 2006)
<i>Mammalian macrophages</i>	N.e.	(Strelko <i>et al.</i> , 2011)
N.e.(Não especificado)		

Uma alternativa para tentar melhorar a produção de AI consiste na implementação de estratégias de manipulação genética de organismos, seja através da inserção do gene CAD num organismo hospedeiro capaz de expressar a proteína recombinante e dessa forma induzir a nova actividade enzimática (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), ou através do melhoramento genético das estirpe com produção natural de AI. De facto, organismos geneticamente modificados, tais como *A. niger* e *E. coli* demonstraram capacidade para a produção de AI, no entanto com níveis de produção inferiores à produção natural de *A. terreus* (80 g.L⁻¹) (ver Tabela 1.2).

Tabela 1. 2 - Microrganismos geneticamente modificados para a produção de AI.

Microrganismo	Alterações genéticas	Concentração de AI (g.L ⁻¹)	Referências bibliográficas
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expressão do gene <i>cad</i>	<1	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. coli</i> BW25133	Expressão do gene <i>cad</i>	4,1	(Liao & Chang, 2010)
<i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	Expressão do gene <i>cad</i>	0,6	(Calam <i>et al.</i> , 1939)
<i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	Expressão do gene <i>cad</i> + <i>mtt</i> (transportador mitocondrial)	2,2	(Jore <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus terreus</i>	Modificação da enzima PFK1 (fofofrutoquinase)	45,5	(Tevz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Expressão do gene <i>cad</i>	2,6	(Wang <i>et al.</i> , 2011)

Embora as alternativas à produção de AI ainda sejam ineficazes ao nível da produção, os avanços tecnológicos e a investigação de novos organismos como potenciais plataformas de produção de compostos químicos, nomeadamente ácidos orgânicos, abre novas perspectivas na industrialização deste tipo de processos. Naturalmente, plataformas microbianas com maior capacidade metabólica, ou seja capazes de converter substratos mais baratos em elevadas quantidades de produto sem acumulação de subprodutos e sem comprometer a viabilidade da cultura, terão maior interesse. Além disso, são preferenciais aquelas que apresentarem menos problemas de crescimento em reator. Neste trabalho, a plataforma bacteriana *E. coli* foi investigada como alternativa à produção de AI, precisamente por apresentar todas estas vantagens. Para além disso, o crescimento óptimo da *E. coli* coincide com a temperatura catalítica óptima da enzima chave deste processo, a CAD.

A *E. coli*, devido à simplicidade de manipulação genética e flexibilidade metabólica, tornou-se uma das plataformas microbianas com maior potencial na produção de ácidos orgânicos (Lee, 1996; Schmidt, 2004). Várias fontes de carbono podem ser utilizadas no seu crescimento, sendo a glucose o substrato mais utilizado experimentalmente, mas outros substratos mais baratos podem também ser usados, tais como o glicerol ou resíduos lignocelulósicos (Carlson & Srienc, 2004; Yu *et al.*, 2011; Martínez-Gómez *et al.*, 2012). Num processo catalítico mais simples em que a fonte de carbono e energia é um açúcar, todo o carbono é oxidado em vias metabólicas centrais, como a glicólise e ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de *Krebs* ou TCA), produzindo poder redutor (NADH e/ou FADH₂) que é depois usado na fosforilação oxidativa produzindo a energia (ATP) necessária para a maioria dos processos celulares (Carlson & Srienc, 2004; Shiloach & Rinas, 2009). Se a fonte de carbono se encontra em excesso pode haver produção de subprodutos. No caso da *E. coli* o mais comum é o acetato, o que reduz o rendimento final do processo. A acumulação de acetato é normalmente associada à incapacidade das enzimas do TCA em converter todo o fluxo de carbono que chega até ao acetil-CoA em mais energia. Assim, o excesso de acetil-CoA é convertido em acetato pela acção das enzimas fosfotransacetilase e acetato quinase. No entanto, o acetato também poderá ser usado como fonte de carbono (designada por fonte de carbono gluconeogénica) por utilização da via do ciclo do glioxilato (Kornberg, 1966; Guardia Alba & García Calvo, 2001; Carlson & Srienc, 2004; Phue *et al.*, 2005). Na Figura 1.4 está representado de forma simplificada um esquema do metabolismo da glucose e do acetato na *E. coli*.

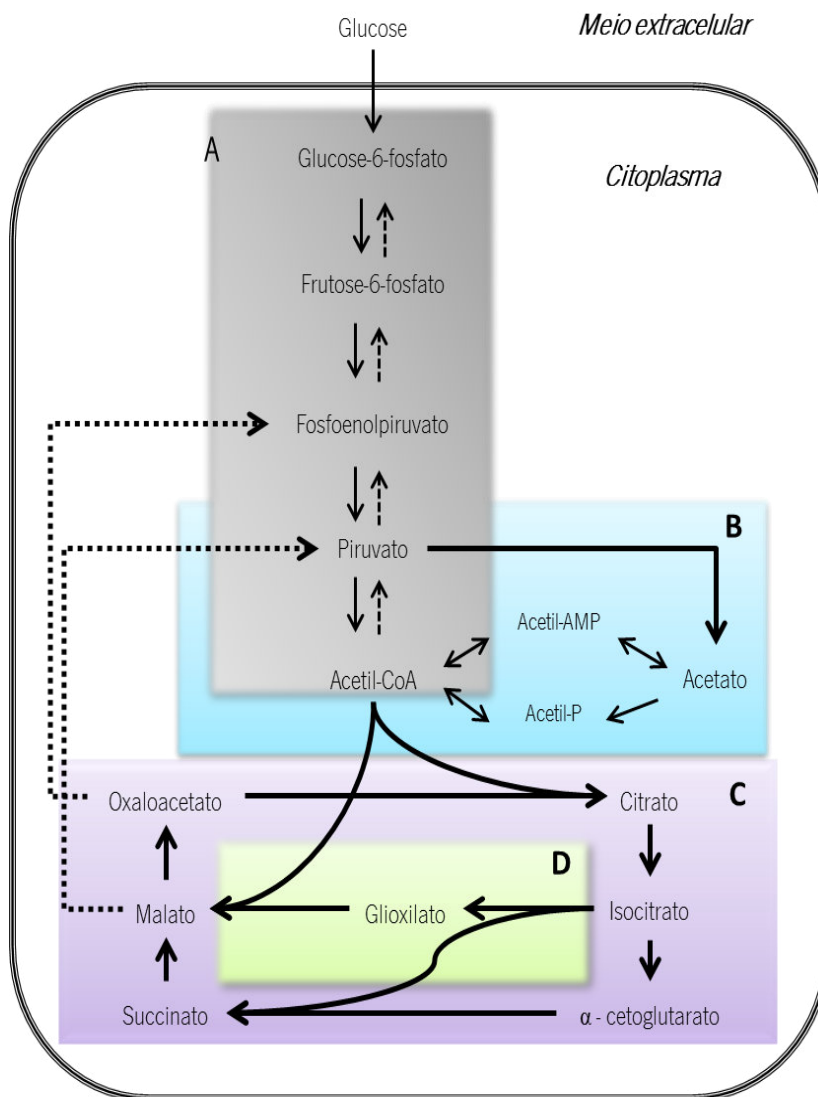


Figura 1.4 - Metabolismo da glucose e do acetato em *E. coli* (adaptado de Phue *et al.*, 2005; Shiloach & Rinas, 2009), (A) glicólise e gluconeogénese, (B) formação e assimilação de acetato, (C) ciclo TCA e (D) via glioxilato.

A distinção entre fontes de carbono gluconeogénicas e não gluconeogénicas é relevante na produção de AI em *E. coli*, uma vez que foi descrito que o AI tem um efeito inibitório sobre a via do glioxilato (Mcfadden & Purohit, 1977; Bellion & Kelley, 1979). Deste modo, é crítica a escolha da fonte de carbono a usar durante o processo fermentativo, dado que de um modo geral os substratos gluconeogénicos requerem a actividade do ciclo do glioxilato.

1.4. Bioprocessos para a produção de AI

1.4.1. Processos de fermentação descontínua (ou em *batch*)

Ao nível industrial, o AI é essencialmente produzido por fermentação em modo *batch*, seja em reator air-lift (ALR, do inglês *air-lift reactor*) ou em reator de tanque agitado (STR, do inglês *stirred-tank reactor*). Por exemplo, o ALR foi aplicado em processos fermentativos para a produção de AI, apresentando melhores resultados em comparação com o STR (a taxa de produção de AI duplicou em ALR) (Yahiro *et al.*, 1997). Siru, J. (1997) também estudou a produção de AI em fermentações em ARL e STR usando glucose e cana de açúcar como fonte de carbono. Neste estudo a concentração de AI aumentou cerca de 14% em ALR, com rendimentos e produtividade superiores (cerca de 16% e 38%, respectivamente) em comparação com os resultados obtidos em STR. Yahiro *et al.*, (1997) investigaram a produção de AI utilizando um STR de 2 L, obtendo uma produção máxima de 0,48 g.h⁻¹ de AI, com uma taxa de agitação de 400 rpm e uma taxa de arejamento de 0,5 Vvm. Em ARL, a taxa máxima de produção aumentou para 0,64 g.h⁻¹ com uma taxa de fornecimento de O₂ de 0,41 L(O₂).L⁻¹.min⁻¹. Assim, é possível afirmar que um biorreator ALR seria o mais adequado para a produção em grande escala de AI.

No processo descontínuo implementado pela Pfizer, é possível obter ao fim de 4 dias uma concentração de 71 g.L⁻¹ de AI, correspondendo a uma produtividade de 1 g.L⁻¹.h⁻¹. Outros estudos (Batti & Schweiger, 1963; Willke & Vorlop, 2001; Reddy & Singh, 2002) apresentam concentrações tanto ou mais elevadas de produto (75 g.L⁻¹, 87 g.L⁻¹ e 70 g.L⁻¹, respetivamente) em condições comparáveis; contudo, as taxas de produtividade são relativamente mais baixas (0,66 g.L⁻¹.h⁻¹, 0,66 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,44 g.L⁻¹.h⁻¹, respetivamente).

1.4.2. Processos de fermentação contínua (ou em quimiostato)

No sentido de melhorar a produtividade do produto final, os processos contínuos são vistos como possíveis alternativas face aos processos descontínuos, uma vez que podem ser operados em condições ótimas por um período de tempo mais longo. Além disso, podem superar alguns problemas de inibição do produto final através da substituição contínua do meio de crescimento. Em fermentação contínua a produtividade de AI pode ser até quatro vezes superior à obtida em fermentação descontínua (cerca de 1,2 g.L⁻¹.h⁻¹), consoante descrito por Kautola, (1987). Contudo, os escassos resultados obtidos com processos contínuos utilizando biomassa em suspensão

apresentaram rendimentos baixos, obtendo-se baixas concentrações de produto final, entre 8 e 15 g.L⁻¹ e respetivas produtividades entre 0,32 e 0,48 g.L⁻¹.h⁻¹ consoante observado por Kobayashi & Nakamura (1966). Segundo Horitsu *et al.*, (1983) a produtividade poderia ser incrementada usando células imobilizadas em gel de poliácridamida. No entanto, conhecem-se poucos casos de sucesso com a utilização destes sistemas para a produção de Al.

1.4.3. Influência de parâmetros fisiológicos na produção de Al

Para além do modo de cultura, a eficiência dos processos também depende dos parâmetros fisiológicos da plataforma microbiana e das condições de cultura utilizadas durante o processo fermentativo. Designadamente, a composição do meio de fermentação, bem como outros parâmetros operacionais (arejamento, agitação, etc) afectam o processo e devem ser considerados na optimização destes bioprocessos.

Factores nutricionais

A utilização de Al a nível industrial, como mencionado anteriormente, tem sido limitada pelo facto da produção de Al ainda ser dispendiosa, o que mantém o preço relativamente elevado desta matéria-prima. O uso de substratos alternativos e de baixo custo pode ajudar na redução dos custos e proporcionar um mercado aberto para novas aplicações. Willke & Vorlop, (2001) investigaram a produção de Al em fermentação contínua de *A. terreus*, utilizando várias fontes de carbono. A sacarose foi sugerida como a fonte de carbono mais adequada, obtendo-se um rendimento máximo de 60 g.L⁻¹ de Al. Kautola *et al.*, (1991) investigaram a produção de Al utilizando células de *A. terreus* TTK 200-5-1 imobilizadas, tanto em fermentação *batch* como em contínuo, em diferentes condições de fontes de carbono e azoto e pH do meio fermentativo. Os resultados mostraram uma elevada produção de Al usando glucose e na ausência de nitrato de amónio (fonte de azoto). Tal como demonstrado anteriormente por Yahiro *et al.* (1997), as fontes de azoto inorgânico (neste caso fosfato de amónia e sulfato de amónia) têm pouca influência sobre o crescimento de *A. terreus* (Yahiro *et al.*, 1997). Ao contrário de alguns microrganismos que requerem elevadas concentrações de azoto, nomeadamente azoto orgânico proveniente de aminoácidos, o *A. terreus* não parece ter carências nutricionais relacionadas com o azoto.

Efeito do pH

O pH do meio pode afetar o crescimento e a formação de produtos, influenciando a absorção de nutrientes e outras atividades fisiológicas. Em culturas de *A. terreus* foi observada uma maior acumulação de Al em condições ácidas, ou seja a um pH abaixo de 6,0 (Lockwood & Reeves, 1945; Moyer & Coghill, 1945; Nelson *et al.*, 1946). Comparando o desempenho fermentativo de culturas de *A. terreus* a diferentes pHs, nomeadamente a 2,1 e 6,0, pode observar-se que, por exemplo, o balanço molar de carbono de culturas a pH 2,1 apresenta uma total conversão do carbono em biomassa, CO₂ e Al; enquanto que a um pH de 6,0 o carbono é convertido em biomassa e outros subprodutos, tais como succinato, fumarato e CO₂ (Eimhjellen & Larsen, 1955). Assim sendo, o efeito do pH do meio no metabolismo e rendimento final de Al é crítico e deve ser controlado durante o bioprocessamento.

Efeito da temperatura

A temperatura afecta o crescimento, metabolismo e a viabilidade de qualquer organismo. Yahiro *et al.*, (1997) demonstraram que a temperatura ótima para o crescimento e a formação de Al em *A. terreus* era de 37°C. Rafi & Hanumanthu, (2012) estudaram diferentes temperaturas (28, 30, 32, 34, 36, e 38°C) para determinar o efeito destas sobre a produção de Al em *U. maydis*. A produção máxima de Al foi de aproximadamente de 30g. L⁻¹ a 34°C, diminuindo gradualmente a partir desse valor até 38°C. Por outro lado, Meena & Sumanjali, (2010) demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo no crescimento celular e metabolismo, mas não apresenta qualquer efeito na produção final de Al. Porém, este estudo sugere que a temperatura ótima para a obtenção do rendimento máximo de Al é de 35°C, o que está de acordo com as observações feitas por Kautola *et al.*, (1985), que obteve uma produção máxima de Al a 35°C em *A. terreus*.

Efeito do volume de inóculo

Um dos factores que pode ter maior relevância ao nível industrial é a preparação do inóculo. Contudo, existe muito pouca informação sobre a influência do inóculo nos processos fermentativos para a produção de Al. Embora alguns autores apontem a utilização de 15% de inóculo para obter a produção eficiente de Al (Hashimoto *et al.*, 1989; Tabuchi 1981), apenas 5-10% do volume do inóculo tem sido usado em muitos dos estudos sobre a produção de Al. Kawamura *et al.*, (1981)

observaram que o aumento do volume de inóculo (15-20%) não aumenta a produção de AI, o que sugere, de facto, que o valor de 15% poderá ser adequado em processos à escala industrial.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

Neste capítulo será descrito o trabalho experimental realizado. Os processos fermentativos, bem como informações relativas aos equipamentos, os meios de cultura, os microrganismos e reagentes químicos utilizados, são aqui detalhados.

2.1 Fermentações

2.2 Métodos analíticos

2.3 Ensaios de crescimento e produção

2.1. Fermentações

2.1.1. Estirpes

Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes de *E. coli*: uma estirpe recombinante BL21(DE3) contendo um plasmídeo pET52-CAD fornecida por An Li do grupo “Microbiology and Systems Biology” em TNO, Holanda (Li *et al.*, 2011), e uma estirpe não-recombinante W3110 (derivada da *E. coli* K12). A estirpe recombinante foi clonada com o plasmídeo pET52 (Novagen) contendo o gene CAD de *A. terreus* e foi utilizada para avaliar a produção de AI em *E. coli*, mais especificamente para compreender o efeito de diferentes pHs na produção máxima de AI. Por outro lado, a estirpe não-recombinante foi utilizada para entender o efeito da adição de AI ao meio fermentativo nos parâmetros fisiológicos de culturas com diferentes substratos.

Ambas as estirpes foram criopreservadas a -80°C com adição de glicerol 30% (v/v), após colheita de aliquotas de 1 mL de cultura na fase exponencial em meio M9. Cada aliquota foi utilizada para a inoculação das culturas dos diferentes ensaios, após descongelamento progressivo desde -80°C, -20°C até à temperatura ambiente.

Nota: Embora tenham sido usadas duas estirpes diferentes de *E. coli* durante este trabalho, a utilização independente de ambas não afecta a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que os ensaios tinham propósitos bem definidos que não dependem da estirpe em questão. Mais detalhes serão apresentados na discussão de resultados

2.1.2. Meios de cultura

O meio de cultura sintético M9 modificado (ou meio mínimo) foi utilizado em todas as fermentações e é composto conforme descrito nas Tabela 2.1, 2.2 e 2.3. Para além dos componentes base do meio M9 foi ainda adicionada ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) no caso do cultivo da estirpe recombinante.

Na preparação do meio de cultura, os compostos marcados com (1) na Tabela 2.1 foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave durante 20 minutos à temperatura de 121 °C. A solução dos compostos (2) foi esterilizada por filtração com acrodiscos estéreis de 0,2 μm de porosidade e 25 mm de diâmetro (Rocha & Ferreira, 2002). A fonte de carbono é normalmente misturada com a solução (1) nas concentrações de 5 g.kg^{-1} , como no caso da

Capítulo 2: Materiais e Métodos

glucose, mas dependendo da fonte de carbono a usar (p.e. acetato) a solução pode ser filtrada com acrodiscos estéreis de 0,2 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro e depois adicionada ao meio estéril.

Tabela 2. 1 - Composição do meio de cultura sintético M9 modificado.

Composto	Concentração (g.kg ⁻¹)	Modo de esterilização
Na ₂ HPO	6	1
KH ₂ PO ₄	3	1
NaCl	0,5	1
NH ₄ Cl,	1	1
CaCl ₂	0,5	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12	1
Tiamina	0,34	1
Solução de traços de minerais	2*	2
Solução de vitaminas	2*	2

*As unidades destas soluções são mL.Kg⁻¹

Nas Tabelas 2.2 e 2.3 indicam-se as composições das soluções de minerais e vitaminas utilizadas.

Tabela 2. 2- Composição da solução de Traços Minerais.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
FeCl ₃	27
ZnCl ₂	2
CoCl ₂	2
NaMoO ₄	2
CaCl ₂	1
CuCl ₂	1
H ₃ BO ₃	0,5
HCl	100 *

*unidade: mL.L⁻¹

Tabela 2. 3 - Composição da solução de Vitaminas.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
Riboflavina	0,42
Ácido Pantoténico	5,4
Ácido Nicotínico	6,1
Piridoxina	1,4
Biotina	0,06
Ácido Fólico	0,042

2.1.3. Preparação do inóculo

Os inóculos usados nas diferentes experiências foram preparados com meio M9 e glucose (5 g.L⁻¹), em matrizes de 500 mL com um volume final de 200 mL. Nas fermentações em que o acetato foi usado como uma das fontes de carbono, o meio M9 foi preparado com 2,55 g.L⁻¹ de glucose (50%) e 3,49 g.L⁻¹ de acetato (50%) de modo a apresentar a mesma concentração molar de carbono que os outros inóculos.

Na preparação do inóculo utilizaram-se alíquotas de 1mL das respectivas estirpes de *E. coli*, conforme descrito anteriormente em 2.1.1. Os inóculos foram colocados numa incubadora orbital, a 37°C e 150 rpm, *overnight*, até se atingir uma densidade ótica (DO) de aproximadamente 1,2 a um comprimento de onda de 600 nm (A_{600}).

2.2. Métodos Analíticos

2.2.1. Determinação da concentração de biomassa

A determinação da concentração de biomassa foi efectuada através da leitura da absorvância das amostras a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600} nm) utilizando água destilada como branco. A concentração de biomassa foi calculada recorrendo a uma curva de calibração de DO *versus* peso seco. A curva de calibração é determinada por leitura da densidade ótica de suspensões, em triplicado, obtidas por diluição de uma suspensão inicial de células de densidade ótica e concentração em peso seco conhecidas. O peso seco desta suspensão é determinado do seguinte modo:

(I) colocam-se seis filtros com porosidade de 0,2 µm em placas de petri numeradas no microondas durante 10 minutos;

(II) deixa-se arrefecer os filtros num exsicador durante aproximadamente 20 minutos;

(III) pesam-se os filtros numa balança analítica;

(IV) filtram-se 10 mL da suspensão celular em cada filtro;

(V) colocam-se novamente os filtros no microondas durante 10 minutos;

(VI) repetem-se os pontos (II) e (III) até o valor do peso do filtro ser constante;

(VII) o peso seco da biomassa obtém-se pela diferença entre o valor do peso do filtro com a biomassa e o seu peso inicial.

As retas de calibração da biomassa obtidas para cada uma das estirpes utilizadas são apresentadas em anexo na Figura A.1.

2.2.2. Determinação da concentração de glucose

A concentração de glucose foi determinada com um *kit* enzimático *D-Glucose Assay, UV-Method* (R-Biopharm, Alemanha), de acordo com as indicações do fornecedor. A leitura da DO das amostras e dos padrões foi feita num leitor de microplacas *Elisa Synergy HT* (Bio-Tek, EUA) com um comprimento de onda de 340 nm. A curva de calibração foi determinada para soluções com concentrações compreendidas entre 0,5 e 7,5 g.L⁻¹ (ver Figura A.2).

2.2.3. Determinação da concentração de metabolitos extracelulares

Para a deteção e quantificação de ácidos orgânicos no meio extracelular usaram-se métodos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

HPLC

A capacidade de deteção e quantificação dos ácidos orgânicos (ácido acético, propionato, itacónico, cítrico entre outros) foi inicialmente avaliada por HPLC. Foram determinados os tempos de retenção para cada ácido orgânico e ajustadas as condições analíticas usadas (caudal e temperatura) para uma melhor separação dos picos de interesse. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de modo a testar as gamas de concentrações a usar para cada composto

e avaliar linearidade na resposta do sinal (R^2 próximo de 1) para a gama de concentrações testadas (ver Figura A.3).

O sistema cromatográfico é constituído por um cromatógrafo Jasco equipado com uma bomba Jasco modelo 880-Pu e um injector automático AS-2057 Plus, provido de um loop de 20 μ L. A detecção foi feita simultaneamente com um detector UV/Vis Jasco, modelo UV-2070 plus, de comprimento de onda variável e um detetor por índice de refração Jasco, modelo 1530-RI. Na aquisição e tratamento dos dados o *software* utilizado foi o *Star Chromatography Workstation*, marca Varian, versão 6,30.

A separação cromatográfica foi conseguida usando uma coluna cromatográfica modelo *Varian Metacarb 67H*. A coluna foi colocada no interior de um forno Chrompack HCT (Holanda) a 60°C. O eluente utilizado foi H_2SO_4 0,005 M, filtrado usando membranas de 0,45 μ m de porosidade e 47 mm de diâmetro e desgasificado, durante pelo menos 15 minutos, num banho ultra-sons, marca Sonicator SC-52, antes de serem utilizados, com um caudal fixo em 0,7 mL.min⁻¹.

As amostras foram previamente filtradas antes da injeção.

GC-MS

Para a análise por GC-MS, foi liofilizado 1 mL de sobrenadante de cultura (em triplicado). Após liofilização, as amostras foram ressuspensas em 200 μ L de hidróxido de sódio (1M) e derivatizadas com o método do metilcloroformato (MCF) (Villas-Bôas *et al.*, 2003). Após a derivatização, as amostras foram analisadas num sistema GC-MS (Varian 269 GC-MS 4000). O sistema é composto por um cromatógrafo gasoso (Varian CP-3800) equipado com um injector automático (CP-8410) e acoplado a um espetrómetro de massas com modo de ionização por impacto de electrões (EI) e analisador Ion Trap (Varian 4000). Está equipado com uma coluna capilar ZB1701 – GC (30m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,15 μ m espessura) e uma pré-coluna de 5 m (Phenomenex). A temperatura do forno foi definida inicialmente a 45°C durante 2 minutos. Depois disso a temperatura foi aumentada, com um gradiente de 9°C/minutos até 180°C. Esta temperatura foi mantida por 5 minutos. Em seguida a temperatura foi aumentada com um gradiente de 40°C/minutos até 220°C mantendo-se durante 5 minutos, sendo aumentada novamente com o mesmo gradiente até 240°C, mantendo-se agora durante 11,5 minutos. Finalmente a temperatura foi aumentada com o mesmo gradiente até 280°C mantida durante 2 minutos. A temperatura do injector foi de 290°C e a temperatura de interface de 250°C. Foi injectado 1 μ L de amostra, com um intervalo de varredura de 1,47 segundos, numa gama de 38-

650 m/Z. Os espectros de massa relativos a cada amostra foram analisados recorrendo ao software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) (Stein, 1999), tendo sido usada uma biblioteca de espectros dos padrões para identificar os compostos presentes.

2.3. Ensaios de crescimento e produção

2.3.1. Efeito da presença de Al no meio de cultura

Os ensaios experimentais relativos ao efeito da adição de Al no crescimento da *E.coli* W3110 (denominada experiência 1) foram realizados em matraz de 500 mL com 200 mL de meio M9. Os ensaios foram realizados com diferentes fontes de carbono: 5g.L⁻¹ de glucose, 2g.L⁻¹ de acetato de sódio e 2 g.L⁻¹ de propionato; usando diferentes concentrações de Al de 0; 0,1 e 1 g.L⁻¹. As soluções de glucose, acetato de sódio, propionato e Al foram filtradas com acrodiscos de 0,2 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro antes de adicionadas ao meio M9. O pH inicial do meio foi acertado com NaOH ou HCl para aproximadamente 7, mantendo a esterilidade do meio de cultura. Na Figura 2.2 é apresentado um esquema que resume as diferentes fermentações realizadas neste ensaio.

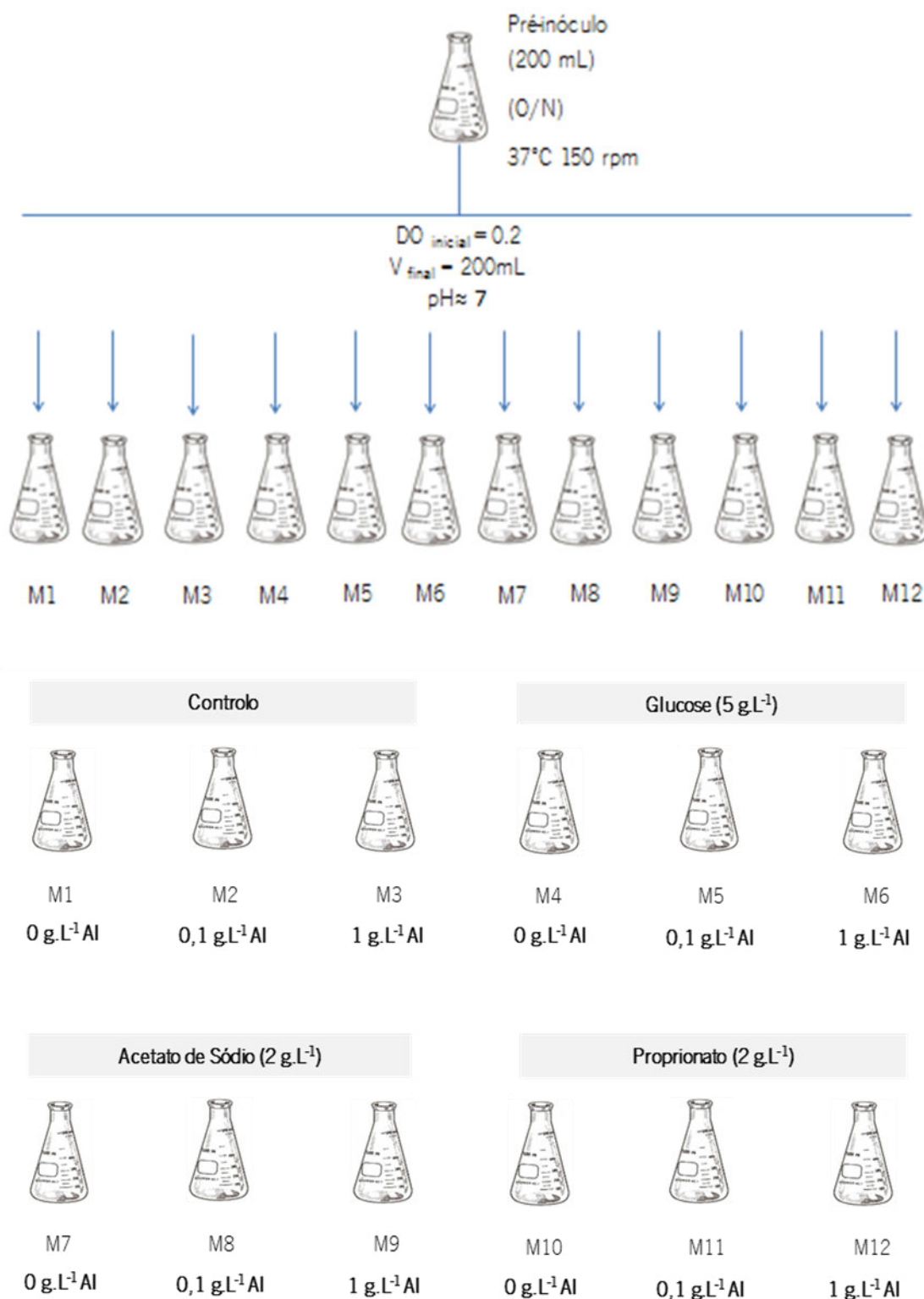


Figura 2.1 - Ensaio de crescimento com *E.coli* W3110 em diferentes fontes de carbono e concentrações de Al. Ao controlo não foi adicionada qualquer fonte de carbono. Foi usado um mesmo inóculo para inocular os diferentes matrazes de modo a iniciar-se com a mesma densidade celular (cerca de uma DO de 0,2).

Capítulo 2: Materiais e Métodos

Preparou-se um inóculo em meio M9 e glucose nas condições descritas em 2.1.3, a partir do qual se retirou a mesma quantidade de células lavadas para cada um dos matrizes do ensaio de modo a ter aproximadamente uma $DO_{inicial}$ de 0,2. A lavagem das células foi feita por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos e ressuspensão do *pellet* com meio M9 sem qualquer fonte de carbono.

Após inoculação de cada matraz, foram colocados numa incubadora orbital, a 37°C e 150 rpm durante aproximadamente 6 horas, para as experiências em que a fonte de carbono era glucose, e cerca de 21 horas, para as experiências em que a fonte de carbono era acetato ou propionato, retirando pontos de hora em hora de modo a obter uma curva de crescimento e a respectiva taxa de crescimento para cada ensaio. Para evitar problemas de crescimento devido a restrições de oxigénio, os matrizes foram arejados em condições estéreis recorrendo a uma bomba de aquário (ver Figura 2.2).



Figura 2.2 - Fotografia da incubadora orbital e respectiva instalação experimental.

Os ensaios foram feitos em duplicado e avaliadas as concentrações em biomassa e substratos por HPLC ao longo dos cultivos. Os seguintes parâmetros fisiológicos foram determinados: rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) e as taxas específicas de crescimentos (μ) calculados por regressão linear baseado no modelo cinético de *Monod*, com os respetivos erros associados.

2.3.2. Determinação do efeito do Al nos parâmetros fisiológicos

Para determinar o efeito da presença de Al nos parâmetros fisiológicos da *E.coli* W3110 foram realizadas culturas em modo *Fed-Batch* (uma fermentação semi-contínua em glucose e outra em acetato de sódio) às quais se adicionou 0,1 g.L⁻¹ de Al após as culturas terem atingido uma DO de aproximadamente 7, denominado como experiência 2.

Inicialmente, para obter uma elevada concentração celular, foi realizado um *Batch* (fermentação descontínuo), num fermentador comercial (BIOSTAT[®] B-DCU II) com uma capacidade máxima de 5 L com um peso inicial de meio de cultura de 2 kg. O meio utilizado foi o M9 (descrito no ponto 2.1.2). No entanto, quando a fonte de carbono era acetato de sódio, a concentração no meio era de 6,97 g.Kg⁻¹ apresentando a mesma concentração molar em base de carbono que o meio com apenas glucose como fonte de carbono. Após a preparação do reator, este foi inoculado com uma suspensão celular previamente preparada de acordo com o descrito no ponto 2.1.3, com uma densidade celular aproximada de 0,1.

O biorreator está equipado com um motor de agitação, uma camisa de controlo de temperatura, um controlador de caudal para arejamento e sondas para controlar o oxigénio, o pH e a temperatura no interior do reator. O fermentador está ligado a uma unidade de Medida e Controlo Digital (DCU – *Digital Control Unit*) que permite também atuar nos elementos essenciais do controlo, nomeadamente nas bombas de adição de ácido e base para o controlo do pH, na velocidade de agitação e no caudal de arejamento para o controlo do mínimo de oxigénio dissolvido e ainda no aquecimento elétrico da água da camisa para o controlo da temperatura. Na Figura A.4 esta representado a instalação experimental do birreactor.

Para esta experiência foi estabelecido o controlo da temperatura a 37°C, pH=7 e do oxigénio dissolvido a 30%. O oxigénio dissolvido foi mantido a 30% numa primeira fase pelo caudal de ar de entrada; quando este atinge o valor máximo definido, o oxigénio é mantido pela velocidade de agitação (modo cascata). Relativamente ao pH, este foi controlado por soluções de ácido orto-fosfórico 15% e de hidróxido de amónia 6%. Todos os controlos de variáveis ambientais foram efectuados automaticamente pela DCU.

Numa segunda fase, após produção de uma elevada densidade celular e todo o substrato ter sido consumido, iniciou-se a fase de *fed-batch* com a adição controlada da solução de alimentação. As soluções de alimentação foram preparadas de acordo com a Tabela 2.4.

Por fim, com o intuito de avaliar o possível efeito inibitório do Al sobre o crescimento de uma estirpe selvagem de *E. coli*, foram adicionados 0,1 g.L⁻¹ de Al a meio da curva de crescimento durante a fase de *fed-batch* de modo a avaliar a alteração dos parâmetros fisiológicos.

Tabela 2. 4 - Composição do meio de alimentação para as fermentações *Fed/Batch*.

Composto	Fermentação Semi- Contínua (1 Kg)	Metodo de esterilização
Glucose	150 g.kg ⁻¹	1
Ou		
Acetato de Sódio	209,1 g.kg ⁻¹	2
NH ₄ Cl	5 g.kg ⁻¹	1
MgSO ₄ .6H ₂ O	2 g.kg ⁻¹	2

1- Autoclave 40 minutos a 121°C.

2- Acrodisco de 0,2 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro.

Em cada fermentação, foram determinadas as concentrações de biomassa, glucose e acetato ao longo do tempo. A glucose foi determinada com *kit* enzimático e o acetato por HPLC. A biomassa foi calculada a partir da curva de calibração de acordo com a Figura A.1-a. Outros metabolitos extracelulares, incluindo o Al, foram analisados por GC-MS.

2.3.3. Avaliação da produção de AI em *E. coli* recombinante e o efeito do pH

A produção de AI com a *E. coli* recombinante BL21(DE3) pET52-CAD (denominada experiência 3) foi avaliada em ensaios em modo descontínuo num bioreator agitado de 5 L (descrito no ponto anterior 2.3.2), com um peso inicial de meio M9 com 5g.L⁻¹ de glucose de 2 kg. Na preparação do meio M9 procedeu-se de forma semelhante descrita em 2.1.2, usando 5g.L⁻¹ de glucose e 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

Nestas experiências foi estabelecido o controlo da temperatura a 37°C e do oxigénio dissolvido a 30%. Com o intuito de avaliar o efeito do pH na produção de AI por este microrganismo, foram realizados três ensaios com pH controlado (pH 7, 6,5 e 6,2). O controlo do pH foi feito por adição de soluções de ácido orto-fosfórico 15% e de hidróxido de amónia 6%. Todos os controlos de variáveis ambientais foram efectuados automaticamente pela DCU.

Para induzir a expressão da enzima CAD foi adicionada uma solução de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) a uma concentração final de 0,75 mM.

Para cada ensaio, foram determinadas as concentrações de biomassa e AI ao longo do tempo. O AI foi determinado por HPLC e GC-MS, enquanto que a biomassa foi calculada a partir da curva de calibração de acordo com a Figura A.1-b

Capítulo 3: Resultados e Discussão

Ao longo deste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios realizados para estudar o efeito do Al no metabolismo da *E.coli* e a sua produção em *E. coli* recombinante.

3.1. Efeito do Al no Metabolismo da *E.coli* W3110

Estes ensaios pretendem responder a questões fundamentais no que respeita à utilização de *E. coli* para a produção de Al. A *E. coli* só poderá ser considerada uma boa plataforma microbiana se não usar este produto como substrato e este não inibir o seu crescimento. Assim sendo, este ensaio teve como principais objectivos: avaliar o efeito da presença de Al no crescimento da *E. coli*; averiguar se o Al pode ou não ser usado como substrato pela *E. coli*; e ainda perceber o efeito do Al em culturas com diferentes fontes de carbono.

Tendo em conta que o Al é reconhecido como um inibidor do ciclo do glioxilato (Mcfadden e Purohit, 1977; Bellion e Kelley, 1979), era fundamental esclarecer o papel do Al no metabolismo da *E. coli* e assim explorar que tipos de substratos podem ou não ser usados na produção de Al. Sendo assim, foram feitas várias fermentações em matraz com *E. coli* W3110 usando diferentes fontes de carbono, às quais foram adicionados diferentes concentrações de Al. Os resultados obtidos mostram que o Al tem efeito sobre o crescimento da *E. coli* dependendo das condições de cultivo (ver Tabela 3.1). As respectivas curvas de crescimento e as concentrações de substrato e Al medidas por HPLC encontram-se em anexo na secção A.3.1.

Tabela 3. 1 - Efeito do Al nos parâmetros de crescimento da *E. coli* W3110 a pH≈7 e a 37 °C em meio M9, usando diferentes fontes de carbono. Nos ensaios de controlo não foi adicionada qualquer fonte de carbono, mas procedeu-se à adição de Al como nos restantes matrazes. Os parâmetros fisiológicos, nomeadamente a taxa de crescimento (μ) e rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) foram determinados na fase exponencial. As concentrações de Al correspondem apenas ao ponto inicial e final das culturas.

	Fontes de carbono											
	Controlo			Glucose			Acetato			Propionato		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
$Al_{inicial}$ (g.L ⁻¹)	–	0,100 ± 0,001	0,950 ± 0,114	–	0,110 ± 0,002	0,980 ± 0,135	–	0,100 ± 0,002	0,950 ± 0,011	–	0,100 ± 0,001	0,960 ± 0,014
Al_{final} (g.L ⁻¹)	–	0,110 ± 0,001	1,040 ± 0,156	–	0,100 ± 0,007	1,000 ± 0,120	–	0,130 ± 0,004	1,100 ± 0,062	–	0,120 ± 0,007	1,130 ± 0,018
μ (h ⁻¹)	X	X	X	0,268 ± 0,008	0,262 ± 0,008	0,240 ± 0,008	0,124 ± 0,019	0,077 ± 0,007	X	0,043 ± 0,007	X	X
$Y_{x/s}$ (g _{Biomassa} . g _{Substrato} ⁻¹)	X	X	X	0,333 ± 0,001	0,327 ± 0,009	0,283 ± 0,008	0,393 ± 0,030	0,261 ± 0,019	X	ID	X	X

(–) Não contém Al; (X) Não apresentaram crescimento celular; (ID) Indeterminado.

Analisando a Tabela 3.1, verifica-se que nas fermentações controlo às quais foram adicionadas diferentes concentrações de Al (M1, M2 e M3), não houve crescimento celular, sugerindo que o Al não deverá ser usado como substrato. Nas fermentações com glucose, verificou-se que não há inibição do crescimento mesmo com concentrações crescentes de Al (de 0,1 para 1 g.L⁻¹, M4 e M5, respectivamente). Contudo, nas culturas com acetato, a inibição do crescimento celular é evidente, baixando a taxa de crescimento de 0,12 para 0,08 h⁻¹ apenas com uma concentração de Al de 0,1 g.L⁻¹ (M7 e M8, respectivamente); havendo uma inibição completa do crescimento com uma concentração de 1 g.L⁻¹ de Al (M9). Analisando ainda os resultados com propionato, as diferentes concentrações de Al parecem inibir por completo o crescimento de *E. coli* (M10 e M11). Contudo, devido a problemas com a determinação do consumo de propionato não foi possível determinar o rendimento, embora pareça haver formação de biomassa.

Pode afirmar-se que o Al afeta a fisiologia da *E.coli* W3110, dependendo da fonte de carbono usada. Nomeadamente, nas culturas que utilizam fontes de carbono gluconeogénicas (por exemplo acetato e propionato), o Al parece inibir consideravelmente o crescimento celular. De facto, a via do glioxilato é essencial na utilização destas fontes de carbono (Oh *et al.*, 2002) e o Al tem sido indicado como um inibidor enzimático da isocitrato liase, a primeira enzima da via do glioxilato (Mcfadden & Purohit, 1977; Zu *et al.*, 1999; Kao *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2009). O mesmo não se verifica quando se utiliza a glucose como fonte de carbono, podendo ser considerado favorável o crescimento em glucose (ou outros açúcares) para a produção de Al.

3.1.1. Determinação do Efeito do Al nos Parâmetros Fisiológicos

Na sequência dos ensaios em matraz e de modo a explorar melhor o efeito do Al na fisiologia da *E. coli* W3110, prepararam-se culturas em modo *Fed-Batch* com adição controlada de substrato de modo a manter a taxa de crescimento, usando duas fontes de carbono, glucose e acetato. Desta forma, pretende-se manter o estado fisiológico da cultura de modo a avaliar alterações metabólicas apenas causadas pela adição de Al durante o cultivo.

A concentração de Al no meio de cultura após adição foi de 0,1 g.L⁻¹, uma vez que os resultados obtidos anteriormente mostram que concentrações próximas de 1 g.L⁻¹ diminuem (embora ligeiramente) a taxa de crescimento em glucose, podendo ser tóxicas para as células ou induzir alterações celulares desconhecidas, embora alguns estudos indiquem que concentrações acima de 1 g.L⁻¹ serão necessárias para inibir completamente o crescimento celular (Mcfadden &

Purohit, 1977; Bellion & Kelley, 1979). Por exemplo, pretende-se neste ensaio manter o crescimento nas culturas com acetato após a adição de Al, de modo a avaliar as alterações fisiológicas e metabólicas dependentes da acção do Al e não de outras respostas associadas à completa cessação de crescimento celular. Na Figura 3.1, estão representadas as respectivas curvas de crescimento para as diferentes culturas.

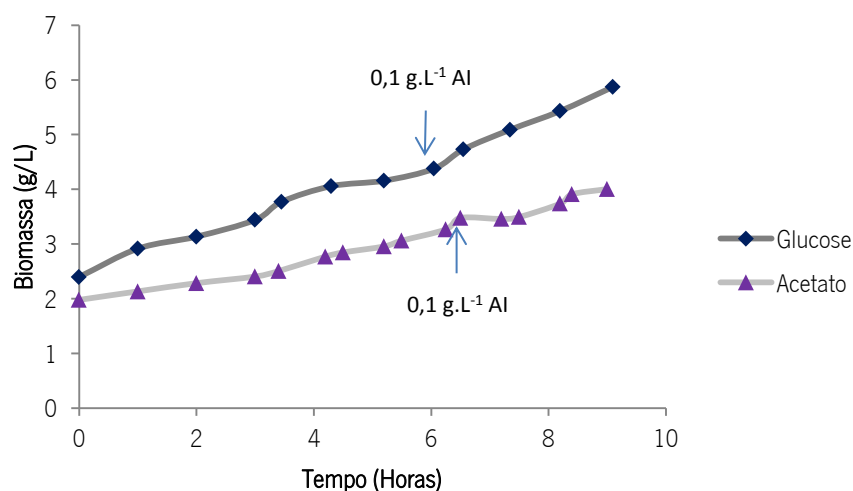


Figura 3.1 – Curva de crescimento da *E. coli* W3110, em modo Fed-Batch com diferentes substratos (glucose e acetato). Estando representado também o ponto ao qual foi adicionado 0,1 g.L⁻¹ de Al

Na Tabela 3.2 são apresentados alguns dos parâmetros fisiológicos, que mostram o efeito do Al na fisiologia da *E. coli* W3110 quando cultivada em *Fed-Batch* com duas fontes de carbono distintas.

Tabela 3.2 - Parâmetros fisiológicos da *E. coli* W3110 em culturas aeróbicas em modo *Fed-Batch*, com diferentes fontes de carbono. As concentrações de substrato adicionadas correspondem a uma mesma concentração molar em base de carbono de 5.1 C-mol.Kg⁻¹. O Al foi adicionado com uma concentração de 0,1 g.L⁻¹ quando a cultura atingiu uma DO_{600 nm} de aproximadamente 7 em glucose e 5 em acetato.

	Fontes de carbono			
	Glucose		Acetato	
	Antes da adição de Al	Após a adição de Al	Antes da adição de Al	Após a adição de Al
$Y_{x/s}$ (g _{Biomassa} C-mol _{Substrato} ⁻¹)	7,02	6,90	5,45	10,00
q_s (C-mol _{Substrato} g _{Biomassa} ⁻¹ .h ⁻¹)	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,003	0,017 ± 0,001	0,008 ± 0,003
μ (h ⁻¹)	0,092 ± 0,024	0,093 ± 0,020	0,093 ± 0,024	0,078 ± 0,020

(μ) Taxa específica de Crescimento; ($Y_{x/s}$) Rendimento em Biomassa; (q_s) Taxa específica de consumo de substrato.

Os resultados mostram que a adição de Al em culturas com glucose não tem qualquer efeito sobre os parâmetros de crescimento da *E. coli* W3110, contrariamente ao que acontece em culturas com acetato de sódio como fonte de carbono. Como se pode observar, na cultura com glucose, a taxa específica de crescimento (μ) manteve-se semelhante após a adição de Al, assim como a taxa específica de consumo de substrato (q_s) e o rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$). Na cultura com acetato de sódio, tanto a taxa específica de crescimento (μ) como a taxa de consumo de substrato (q_s) apresentam uma diminuição acentuada após a adição do Al (de 0,093 para 0,078 h⁻¹ e de 0,017 para 0,0080 C-mol.g_X⁻¹.h⁻¹, respectivamente), o que significa mais uma vez que culturas que utilizam fontes de carbono gluconeogénicas são afectadas pela presença de Al. Estes resultados mostram que a presença deste composto dificultará o catabolismo de fontes de carbono como o acetato possivelmente através da inibição a actividade da ICL, a primeira enzima da via do glioxilato (Dunn *et al.*, 2009).

Por outro lado, é interessante verificar que o rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) parece aumentar na cultura com acetato após a adição de Al (de 5,45 para 10,0 C-g_X.C-mol⁻¹). Embora o erro associado à determinação da taxa de consumo de substrato (q_s) seja elevado, o que pode afectar

também este cálculo, este aumento sugere a acumulação de subprodutos na condição anterior à adição de Al. Para verificar esta hipótese, foram analisadas algumas amostras em GC-MS de modo a quantificar alguns metabolitos extracelulares que possam ser acumulados durante a cultura. Neste estudo foi detectada a acumulação de succinato e citrato no meio de cultura nas duas fases fermentativas antes e depois da adição de Al (ver Tabela 3.3 e secção A.3.2.1.).

Tabela 3.3 – Taxa de acumulação de citrato e succinato no meio de cultura das fermentações em *Fed-Batch*. Os metabolitos extracelulares foram medidos por GC-MS.

	Fontes de carbono			
	Glucose		Acetato	
	Antes da adição de Al	Após a adição de Al	Antes da adição de Al	Após a adição de Al
Citrato ($\mu\text{M.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) $\times 10^3$	16,0	6,0	1431	402
Succinato ($\mu\text{M.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) $\times 10^3$	2,2	0,3	10,6	≈ 0

Os resultados mostram que a acumulação de citrato e succinato na cultura com acetato é substancialmente mais elevada que em glucose. Tanto o citrato como o succinato são intermediários do ciclo de *krebs* e fazem parte da via catabólica do acetato, ou seja do ciclo do glioxilato. Esta via é uma versão simplificada do ciclo de *Krebs*, na qual se perde menos carbonos sob a forma de CO_2 , mas também se forma menos poder redutor. A enzima central nesta via é a isocitrato liase (ICL), que converte citrato em glioxilato e succinato e que, na presença de Al, é normalmente inibida.

Assim, com a adição de Al seria de esperar uma redução na acumulação de succinato e um aumento na acumulação de citrato. Embora se verifique uma redução imediata da acumulação de succinato após adição de Al, indicando uma redução significativa da actividade da ICL; a acumulação de citrato também diminui (de 1,43 para 0,40 $\mu\text{M.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Este facto deve-se essencialmente à redução do consumo de acetato (o q_s é reduzido para cerca de metade), que levará também à redução da acumulação de intermediários metabólicos. O facto de se ter detectado a acumulação tanto de citrato como succinato, mesmo antes da adição, relevou-se inesperado. No entanto, pode estar relacionado com a elevada concentração intracelular deste

metabolitos durante o metabolismo do acetato e a facilidade com que os ácidos orgânicos são drenados das células e rapidamente reutilizados pelas mesmas. Este é um facto ainda controverso, mas vários estudos têm detectado elevados níveis de metabolitos centrais no meio de cultura sem que haja condições de *stress* aparentes (Paczia *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2012).

No que respeita à cultura com glucose, também se verificou uma redução na acumulação de succinato, mas estes resultados não são suficientes para sugerir que a ICL estivesse activa nestas condições ou que a adição de AI tenha inibido a síntese de succinato. De facto, os parâmetros fisiológicos não sugerem qualquer influência da adição de AI no metabolismo da cultura com glucose.

No geral, estes resultados sugerem que a presença de AI limita o metabolismo do acetato, tanto ao nível da ICL como ao nível do consumo do acetato. Contudo, em culturas com glucose, a presença deste inibidor não deverá ter qualquer efeito sobre o metabolismo da *E. coli*. Assim, podemos concluir que a produção de AI em *E. coli* pode ser implementada desde que usando fontes de carbono não gluconeogénicas nos processos fermentativos.

3.2. Avaliação da produção de AI em *E. coli* recombinante e o efeito do pH

Após a avaliação do efeito da presença de AI na fisiologia da *E. coli*, foi testada a capacidade de produção deste composto por expressão recombinante da enzima CAD em *E. coli*. Embora os ensaios anteriores tenham sido elaborados com uma estirpe derivada da *E. coli* K12, a produção de AI com a estirpe BL21 não deverá afectar o metabolismo desta estirpe de forma distinta. De facto, os processos metabólicos implicados são semelhantes entre as duas estirpes e, dado que os ensaios são feitos com glucose como fonte de carbono, não se prevêem alterações fisiológicas para além das testadas neste ensaio.

Tendo por base o que está descrito na literatura relativamente à influência dos parâmetros físico-químicos de uma cultura que podem afetar a produção de AI (Meena & Sumanjali, 2010; Rafi & Hanumanthu, 2012; Sudarkodi *et al.*, 2012), foi proposto avaliar a influência do pH do meio na produção de AI. Como referido anteriormente, a condição do pH é um fator relevante no crescimento celular e consequente acumulação de metabolitos extracelulares. O pH ótimo normalmente é bem definido para cada espécie e diferentes espécies toleram diferentes valores de pH. No entanto, para crescer um microrganismo em meio ácido ou básico, este deve ser capaz de manter o seu pH intracelular em torno de 7,5, independentemente do valor do pH do meio

extracelular. Por sua vez, os microrganismos têm um mecanismo para manter o pH intracelular a um valor relativamente constante apesar do meio extracelular variar à medida que os compostos ácidos ou alcalinos são produzidos (Slonczewski *et al.*, 2009; Meena & Sumanjali, 2010). No entanto, foi descrito que a falta de controlo do pH durante o processo de fermentação pode influenciar a produção de AI resultando em níveis mais baixos (Meena & Sumanjali, 2010).

A produção de AI com *E. coli* recombinante BL21(DE3) pET52-CAD foi avaliada em três processos fermentativos em modo descontínuo com diferentes pHs (6,2; 6,5; 7). Na Figura 3.1 estão representadas as respectivas curvas de crescimento, de consumo de substrato assim como de acumulação de produto (AI). Além disso, na Tabela 3.4, são apresentadas as taxas de crescimento e a respetiva produção de AI para os diferentes pHs.

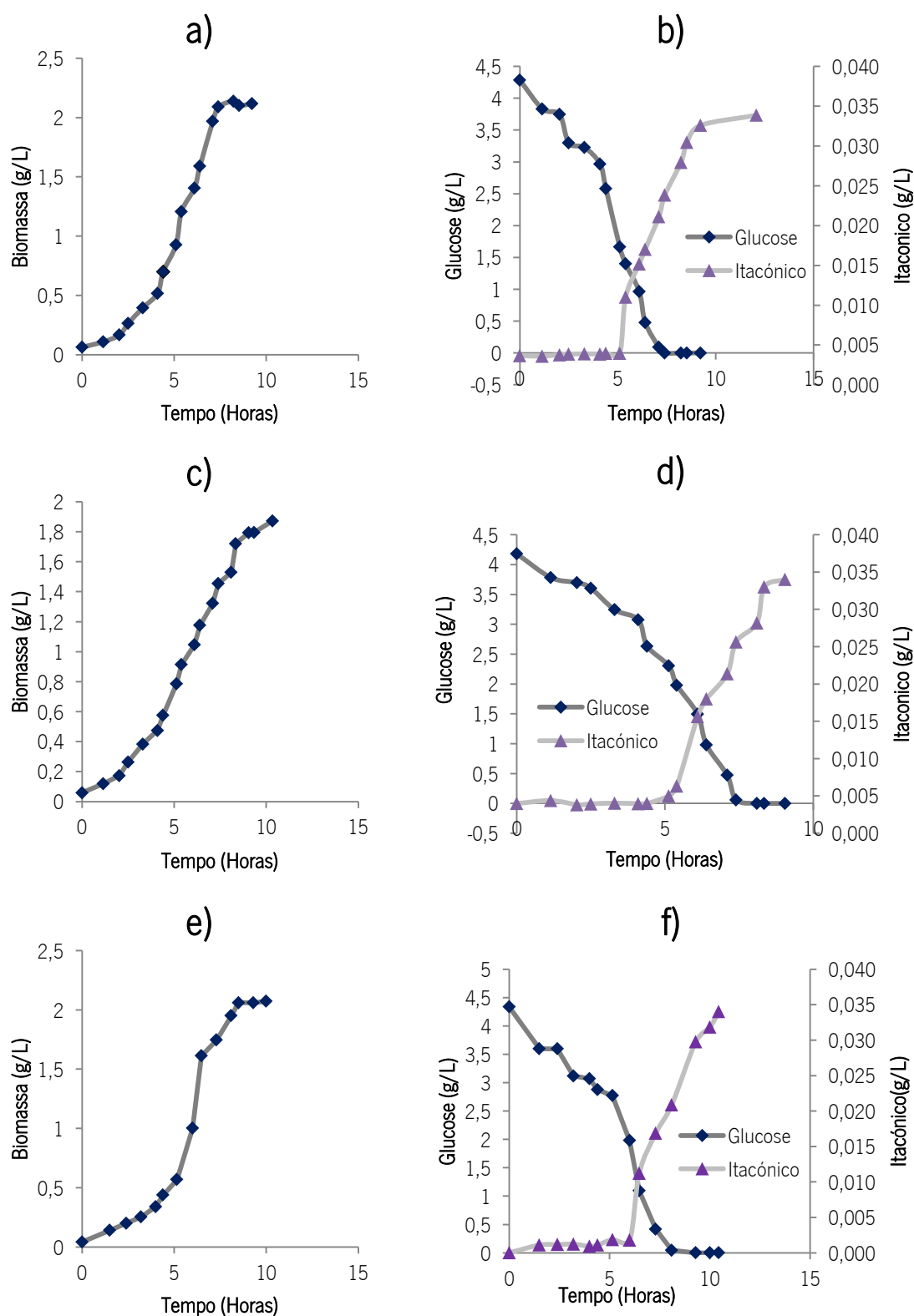


Figura 3.2 - Curvas de crescimento, de substrato e de produto. a) e b) pH 6,2; c) e d) pH 6,5; e) e f) pH 7.

Para as três fermentações foi adicionado 0.75 mM IPTG, logo após as 5 horas de cultivo.

Tabela 3.4 - Efeito do pH sobre o crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) pET52-CAD e consequente produção de AI.

	pH 6,2	pH 6,5	pH 7,0
μ (h ⁻¹)	0,497 ± 0,046	0,350 ± 0,040	0,420 ± 0,070
$Y_{x/s}$ (g _{Biomassa} (g _{Substrato}) ⁻¹)	0,454	0,398	0,465
AI final (g.L ⁻¹)	0,034	0,034	0,034

(μ) Taxa específica de Crescimento; ($Y_{x/s}$) Rendimento em Biomassa;

Tendo em conta estes resultados, é possível observar que o efeito dos diferentes pHs afeta a taxa específica de crescimento (μ), mas parece não afetar a produção final de AI. Contudo, entre os diferentes pHs testados nos processos fermentativos, o que apresenta melhor taxa específica de crescimento é o de pH 6,2, sendo que o de pH 6,5 teve uma taxa de crescimento menor. Aparentemente, o desempenho catalítico da enzima CAD mantém-se independentemente do pH extracelular e da taxa de crescimento, o que está de acordo com a maioria das actividades recombinantes, que parecem desacopladas do metabolismo dos seus hospedeiros, desde que as alterações metabólicas não sejam demasiado restritivas (Jensen & Carlsen, 1990). Neste caso, a gama de pHs testada é pequena, o que provavelmente não induziu alterações significativas no metabolismo intracelular do hospedeiro e permitiu manter o seu pH intracelular a um valor constante apesar de ser alterado o valor de pH extracelular (do meio). Contudo, a análise do exometaboloma (ver Figura 3.1) revelou que para pHs abaixo de 7,0 há a acumulação de citrato e succinato, especialmente após a indução da expressão da enzima CAD. Este facto sugere a redução do rendimento em biomassa e AI para culturas com pHs mais baixos, que deve ser considerado na implementação deste processo com *E. coli*.

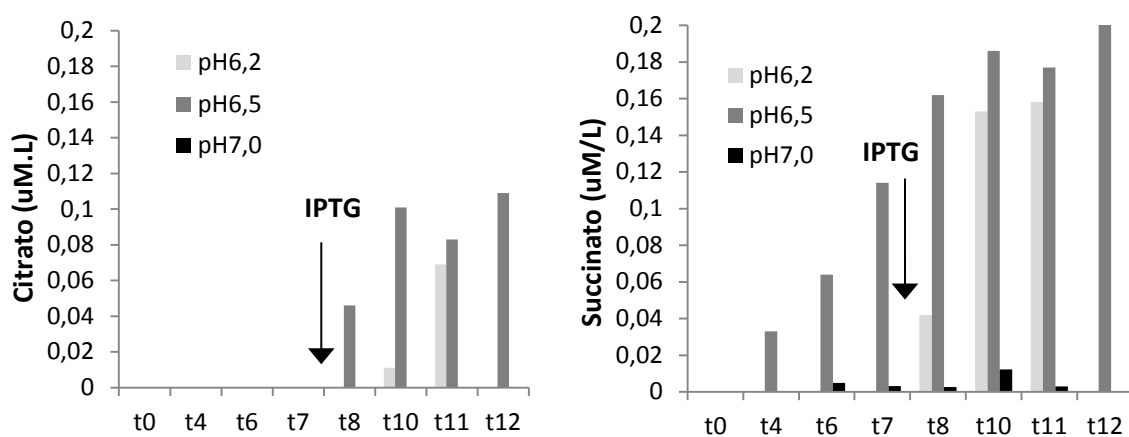


Figura 3.3- Acumulação de citrato e succinato ao longo das fermentações com diferentes pHs. A seta indica o ponto da indução da expressão da enzima CAD e consequente actividade com a adição de IPTG (0,75 mM).

Capítulo 4: Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Neste capítulo são apresentados as principais conclusões do trabalho e algumas sugestões para desenvolvimentos futuros.

Apesar das inúmeras dificuldades operacionais associadas ao crescimento de fungos filamentosos, a produção de AI por fermentação com *A. terreus* continua a ser a mais vantajosa ao nível industrial. Embora tenham sido avaliadas várias plataformas microbianas, os níveis de produção de AI continuam abaixo dos obtidos com *A. terreus*, o que impede a implementação de novas alternativas. Todavia, os constantes desenvolvimentos tecnológicos devem ser considerados na (re)avaliação deste tipo de processos biológicos. A *E. coli*, tal como outras plataformas de fácil manipulação genética, continua a ser de elevado interesse para a produção industrial de diversos ácidos orgânicos.

Os ensaios realizados durante este trabalho permitiram verificar a capacidade de produção de AI com *E. coli* recombinante e avaliar o efeito deste composto no metabolismo do hospedeiro. No que diz respeito ao estudo do efeito do AI no metabolismo da *E. coli* W3110 (não recombinante) em cultura com diferentes substratos, os resultados sugerem que a produção de AI em fontes de carbono gluconeogénicas, cujo catabolismo depende da actividade da ICL, pode não ser viável. No entanto, fontes de carbono como açúcares (glucose, xilose, etc) parecem ser adequadas à produção de AI, não havendo restrições no crescimento celular durante a fase de produção. Para além disso, confirmou-se que o AI não é usado como fonte de carbono pela *E. coli*, facto que poderia afetar a produtividade final do processo.

Em relação ao estudo do efeito do pH na produção de AI em *E. coli* recombinante, constatou-se que diferentes pHs podem afetar o crescimento celular. No entanto, parecem não influenciar a produção final de AI. Assim, será possível afirmar que pequenas alterações no pH extracelular durante o processo fermentativo não deverão afectar a produção final deste composto, embora as condições testadas não sejam suficientes para prever o efeito das alterações noutras gamas de pH na síntese do AI. No que diz respeito às concentrações de AI obtidas, os níveis de produção foram baixos, o que poderá indicar a necessidade de testar outras condições fermentativas para avaliar a produção ótima de AI. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho e a perspectiva de implementar outras estratégias de engenharia avançadas, sugere-se como trabalho futuro:

- Determinar o nível de expressão da proteína CAD na *E. coli* recombinante e avaliar a sua atividade enzimática de modo a estimar se as condições catalíticas estão ao nível da CAD em *A. terreus*;

- Clonar o gene CAD em plasmídeos com diferentes promotores e testar diferentes condições de indução da expressão da proteína;
- Avaliar outras condições fermentativas, desde outras gamas de pH, temperatura, agitação, fase de indução, etc, recorrendo a um modelo de desenho experimental para avaliar a produção ótima de AI em *E. coli* recombinante;
- Testar abordagens de engenharia metabólica para melhorar o desempenho metabólico da *E. coli* para a produção de AI, nomeadamente estratégias de mutação e manipulação direcionada da expressão de genes metabólicos.

Capítulo 5: Bibliografía

- Batti, M., & Schweiger, L.B. (1963). Process for the production of itaconic acid. US-Patent 3078 217.
- Bellion, E., & Kelley, R.L. (1979). Inhibition by itaconate of growth of methylotrophic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 138: 519–522.
- Bentley, R., & Thiessen, C.P. (1957a). Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with ¹⁴C-labeled substrates. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 673–687.
- Bentley, R., & Thiessen, C.P. (1957b). Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. II. EARLY STAGES IN GLUCOSE DISSIMILATION AND THE ROLE OF CITRATE. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 689–701.
- Bentley, R., & Thiessen, C.P. (1957c). Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 703–720
- Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A.M., Role, C., & Beloeil, J.C. (1995). Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of Bacteriology*. 177: 3573-3578.
- Bull, A., Ward, A., & Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 573–606.
- Calam, C.T., Oxford, A.E., & Harold, R. (1939). Studies in the biochemistry of micro-organisms. LXIII. Itaconic Acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus* Thom. *Biochemical Journal*. 33: 1488–1495.
- Cao, Y., Xian, M., Zou, H., & Zhang, H. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of xylonate. *PloS One*. 8: 1-7.
- Carlson, R., & Sreenc, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: identification of reactions. *Biotechnology and Bioengineering*. 85: 1–19.
- Carvalho, W., Silva, D., Canilha, L., & Mancilha, I. (2005). Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. *Reviews in Analytical Chemistry*. 18: 70–76.

- Carneiro, S., Villas-Bôas, S.G., Ferreira, E.C., Rocha, I., (2012). Influence of the RelA Activity on E. coli Metabolism by Metabolite Profiling of Glucose-Limited Chemostat Cultures. *Journal of Metabolites*. 2 (4): 717-732.
- De, T.K., Bergey, E.J., Chung, S.J., Rodman, D.J., Bharali, D.J., & Prasad, P.N. (2004). Polycarboxylic acid nanoparticles for ophthalmic drug delivery: an ex vivo evaluation with human cornea. *Journal of Microencapsulation*. 21: 841-855.
- Doran, P., (2013). Bioprocess Development: An Interdisciplinary Challenge. In: Bioprocess Engineering Principles. Ed. Academic Press: Elsevier Science. Pp. 3-10.
- Dunn, M.F., Ramírez-Trujillo, J. a, & Hernández-Lucas, I. (2009). Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*. 155: 3166-3175.
- Dwiarti, L., Yamane, K., Yamatani, H., Kahar, P., & Okabe, M. (2002). Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 29-33.
- Eimhjellen, K.E. & Larsen, H. (1955). The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. II. The effect of substrates and inhibitors. *Biochemistry*. 60:139-147.
- Geilen, F.M.A., Engendahl, B., Harwardt, A., Marquardt, W., Klankermayer, J., & Leitner, W. (2010). Selective and Flexible Transformation of Biomass-Derived Platform Chemicals by a Multifunctional Catalytic System. *Angewandte Chemie*. 122: 5642-5646.
- Guardia Alba, M.J., & García Calvo, E. (2001). Characterization of bioreaction processes: aerobic *Escherichia coli* cultures. *Journal of Biotechnology*. 84: 107-118.
- Guevarra, D.E., & Tabuchi, T. (1990). Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry NII-Electronic Library Service. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54: 2353-2358.
- Gyamerah, M.H. (1995). Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44: 20-26.

- Harms, P., Kostov, Y., & Rao, G. (2002). Bioprocess monitoring. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 124-127.
- Hashimoto, K., Shiray, Y., & Tanigaki, M. (1989). Culture method for microorganism and plant cell. JP-Patent 01 296 977.
- Horitsu, H., Xiao, R., Nakamura, Y., & Kuwai, K. (1983). Production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* immobilized in polyacrylamide gels. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 18:358-360.
- Jaklitsch, W.M., Kubicek, C.P., & Scrutton, M.C. (1991). The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of General Microbiology*. 137: 533-539.
- Jensen, E.B., & Carlsen, S., (1990). Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 36: 1-11.
- Jore, J.P.M., Punt, P.J., & Van Der Werf, M.J., (2011). Production of itaconic acid, Nederlandse organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk onderzoek. US Patent 0124066 A1.
- Kamm, B., & Kamm, M. (2007). Biorefineries-multi product processes. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*. 105: 175-204.
- Kanamasa, S., Dwiarti, L., Okabe, M., & Park, E.Y. (2008). Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 223-229.
- Kane, J.H., Finlay, A.C., & Amann P.F. (1945). Production of itaconic acid. US Patent 2 385 283.
- Kao, K.C., Tran, L.M., & Liao, J.C. (2005). A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 36079-36087.
- Kautola, H., Gronlund, B., Horitsu, H., Linko, Y.Y., & Linko, P. (1987). Optimization of itaconic acid production from glucose by free and immobilized *Aspergillus terreus*. *European Congress on Biotechnology*. 1: 106-109.

- Kautola, H., Rymovicz, W., Linko, Y.Y., & Linko, P. (1991). Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* with varied metal additions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35: 154-158.
- Kautola, H., Vahvaseleka, M., Linko, Y.Y., & Linko, P. (1985). Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose. *Biotechnology Letters*. 7: 167-1728.
- Kawamura, D, Furuhashi, M., Saito, O., & Matsui H. (1981). Production of itaconic acid by fermentation. JP-Patent 56 137 893.
- Kinoshita, K. (1931). Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim*. 5: 271-287.
- Klement, T., & Büchs, J. (2013). Bioresource Technology Itaconic acid – A biotechnological process in change. *Bioresource Technology*.1-10.
- Kobayashi, T. (1967). Itaconic acid fermentation. *Process Biochemistry*. 2: 61-65.
- Kobayashi, T., & Nakamura, I. (1966). Dynamics in mycelia concentration of *A. terreus* K26 456 in steady state of continuous culture. *Journal of Fermentation Technology*. 44: 264-274
- Koops, A.J., De Graaff, L.H., Van Der Meer, I.M., & Van Den Berg, W.A.M., (2011). Nucleotide Sequences Coding for Cis-Aconitic Decarboxylase and Use Thereof. US Patent 0099670.
- Kornberg, H.L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 99: 1-11.
- Kuenz, A., Gallenmüller, Y., Willke, T., & Vorlop, K.-D. (2012). Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96: 1209-1216.
- Lee, S.Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 14: 98-105.

- Levinson, W.E., Kurtzman, C.P., & Kuo, T.M. (2006). Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 824-827.
- Li, A., Van Luijk, N., Ter Beek, M., Caspers, M., Punt, P., & Van der Werf, M. (2011). A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. *Fungal Genetics and Biology*. 48: 602-611.
- Liao, J.C., & Chang, P.C., (2010). Genetically Modified Microorganisms that Produce Itaconic Acid at High Yields and Uses Thereof. Industrial Technology Research Institute. US Patent 8143036.
- Lockwood, L.B., & Reeves M.D. (1945). Some factors affecting the production of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 6: 455-469.
- Luskin, L.S. (1974). Acid monomers - itaconic acid In: Yokum RII Nyquist EB (eds) Functional Monomers their preparation polymerization and application. 2: 465-501.
- Magnuson, J.K., & Lasure, L.L. (2004). Organic Acid Production by Filamentous Fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. 307-340
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H.M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O.T., Gosset, G., Encarnación, S., & Bolívar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*. 11: 1-21.
- Mcfadden, B.A., & Purohit, S. (1977). Itaconate , an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *Journal of Bacteriology*. 131: 136-144.
- Meena, V., & Sumanjali, A. (2010). Production of itaconic acid through submerged fermentation employing different species of *Aspergillus*. *Rasayan Journal*. 3: 100-109.
- Moyer, A.J., & Coghill, R.D. (1945). Production of Pencillin in Submerged Cultures. *Journal of Bacteriology*. 51: 761-777.

- MuralidharaRao, D., Hussain, S.M.D.J., Rangadu, V.P., Krishna, G.S., & Swamy, A.V.N. (2007). Fermentative production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* using Jatropha seed cake. *Journal of Biotechnology*. 6: 2140–2142.
- Nelson, G.E.N., Trauller, D.H., Kelley, S.E., & Lockwood, L.B. (1946). Production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* in 20-liter fermentors. *Industrial & Engineering Chemistry*. 44: 1166-1168.
- Nubel, R.C., & Ratajak, E.D. (1964). Process for producing itaconic acid. US-Patent 3 044 941
- Oh, M.-K., Rohlin, L., Kao, K.C., & Liao, J.C. (2002). Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 13175–13183.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., & Park, E.Y. (2009). Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 597–606.
- Pfeifer, V.F., Vojnovich, C., & Heger, E.N. (1952). Itaconic acid by fermentation with *Aspergillus terreus*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44: 2975–2980.
- Phue, J.-N., Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J., & Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnology and Bioengineering*. 90: 805–820.
- Rafi, M., & Hanumanthu, M. (2012). Effect of different physico-chemical parameters on fermentative production of itaconic acid by *Ustilago maydis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2: 794–800.
- Reddy, C.S.K. & Singh, R.P. (2002). Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR10. *Bioresource Technology*. 85: 69-71.
- Rocha, I., & Ferreira, E.. (2002). On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant *E. coli*. *Analytica Chimica Acta* 462: 293–304.

- Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 363–372.
- Shiloach, J., & Rinas, U. (2009). Glucose and Acetate Metabolism in *E. Coli* – System Level Analysis and Biotechnological Applications in Protein Production Processes. In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. 377-39
- Siru, J. (1997). Enhancement of yeast fermentation by addition of oxygen-vectors in air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84: 176-178.
- Slonczewski, J.L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. 55: 1-79.
- Stanojević, M., Krušić, M.K., Filipović, J., Parojčić, J., & Stupar, M. (2006). An investigation into the influence of hydrogel composition on swelling behavior and drug release from poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels in various media. *Drug Delivery*. 13: 1-7.
- Steiger, M.G., Blumhoff, M.L., Mattanovich, D., & Sauer, M. (2013). Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Frontiers in Microbiology*. 14: 4-23.
- Stein, S.E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 10: 770–781.
- Strelko, C.L., Lu, W., Dufort, F.J., Seyfried, T.N., Chiles, T.C., Rabinowitz, J.D., & Roberts, M.F. (2011). Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *Journal of the American Chemical Society*. 133: 16386–16389.
- Sudarkodi, C., Subha, K., Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2012). Optimization and production of itaconic acid using *Aspergillus flavus*. *Advances in Applied Science Research*. 3: 1126–1131.
- Tabuchi, T., Sugisawa, T., Ishidori, T., Nakahara, T., & Sugiyama, J., (1981). Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45: 475–479.

- Tate, B.E. (1981) Itaconic acid and derivatives. In Encyclopedia of Chemical Technology. Grayson M Eckroth E(eds) Kirk-Othmer Encycl Chem Technol 3: 865-873.
- Tevez, G., Bencina, M., & Legiša, M., (2010). Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1657–1664.
- Paczi, N., Nilgen, A., Lehman, T., Gatgens, J., Wiechert, W., & Noack, S. (2012). Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microbial Cell Factories* 11: 122.
- Villas-Bôas, S.G., Delicado, D.G., Akesson, M., & Nielsen, J. (2003). Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 322: 134–138.
- Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., Wang, Y., Xia, J., & Zhang, S. (2009). Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. *Biotechnology Advances*. 27: 989–995.
- Wang, J.-H., Tsai, S.-H., & Teng, K., (2011). Producing Itaconic Acid in Yeast Using Glycerol as the Substrate. Industrial Technology Research Institute (ITRI). US Patent 0053232.
- Werpy, T., & Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I – Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. 1-68.
- Willke, T., & Vorlop, K.-D. (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 289–295.
- Yahiro, K., Takahama, T., Park, Y.S., & Okabe, M. (1995). Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79: 506–508.
- Yahiro, K., Shibata, S., Jia, S.-R., Park, Y., & Okabe, M. (1997). Efficient itaconic acid production from raw corn starch. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84: 375–377.

- Yu, C., Cao, Y., Zou, H., & Xian, M. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89: 573–583.
- Zawada, J., & Swartz, J. (2005). Maintaining rapid growth in moderate-density *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 89: 407–415.
- Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., & Ingram, L.O. (2003). Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 399–407.
- Zu, H., Miczak, A., Swenson, D.L., & Russell, D.G. (1999). Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in mycobacterium avium and mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*. 181: 7161–7167.

Capítulo 6: Anexos

Nas próximas páginas será apresentado as retas de calibração, a instalação do biorreator, assim como dados utilizados ao longo deste trabalho.

A.1. Curvas de calibração

A.1.1. Curvas de calibração da biomassa

A quantificação da biomassa, g.L⁻¹, foi efetuada através da curva de calibração obtida para cada microrganismo estudado.

Na Figura A.1. estão representadas as linearidades para a gama de concentrações testadas, assim como as expressões representativas da reta de calibração para a concentração celular.

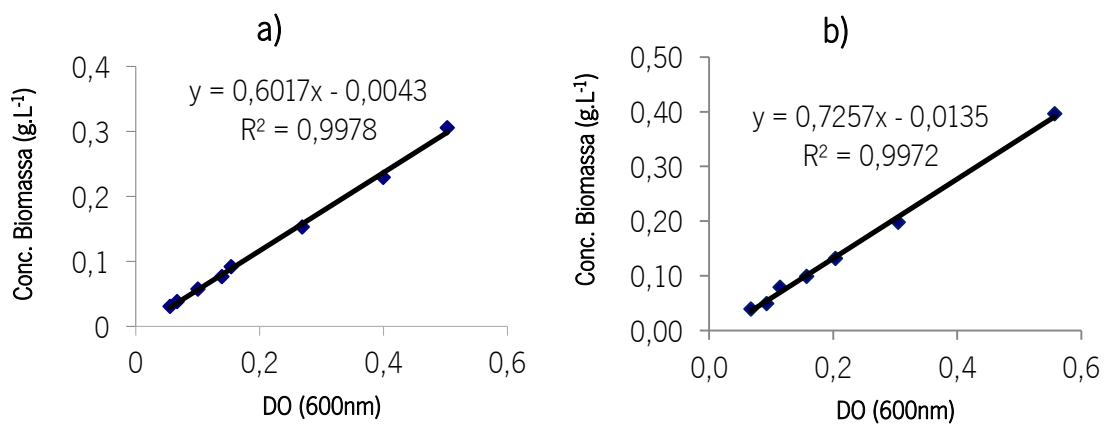


Figura A.1 - Expressão da reta de calibração da biomassa. a) *E. coli* W3110; b) *E. coli* BL21(DE3)-CAD.

A.1.2. Curva de calibração do *Kit* enzimático

A concentração de glucose, g.L⁻¹, foi obtida por *kit* enzimático *D-Glucose Assay, UV-Method* (R-Biopharm, Alemanha), e para tal foi determinada uma reta de calibração de acordo com as indicações do fornecedor.

Na Figura A.2. está representada a linearidade para a gama de concentrações testadas, assim como a expressão representativa da reta de calibração para a concentração da glucose.

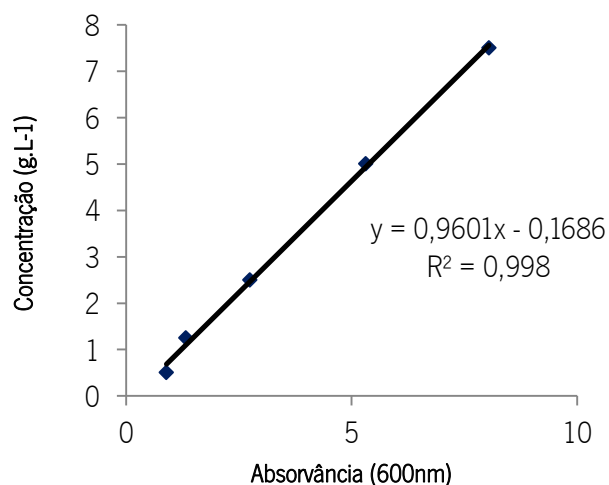


Figura A.2 - Expressão da reta de calibração para determinar a concentração de glucose.

A.1.3. Curva de calibração do HPLC

A quantificação dos compostos analisados, em g.L⁻¹, foi efetuada através da curva de calibração obtida para cada composto.

Para obter estas retas, prepararam-se cinco soluções, com concentrações entre 0.005 g.L⁻¹ e 0.1 g.L⁻¹ para o ácido itacónico e entre 0.5 g.L⁻¹ e 7.5 g.L⁻¹ para o acetato e propionato.

Na Figura A.3. apresenta-se a linearidade para a gama de concentração testadas e as respetivas retas de calibração para a concentração de cada composto.

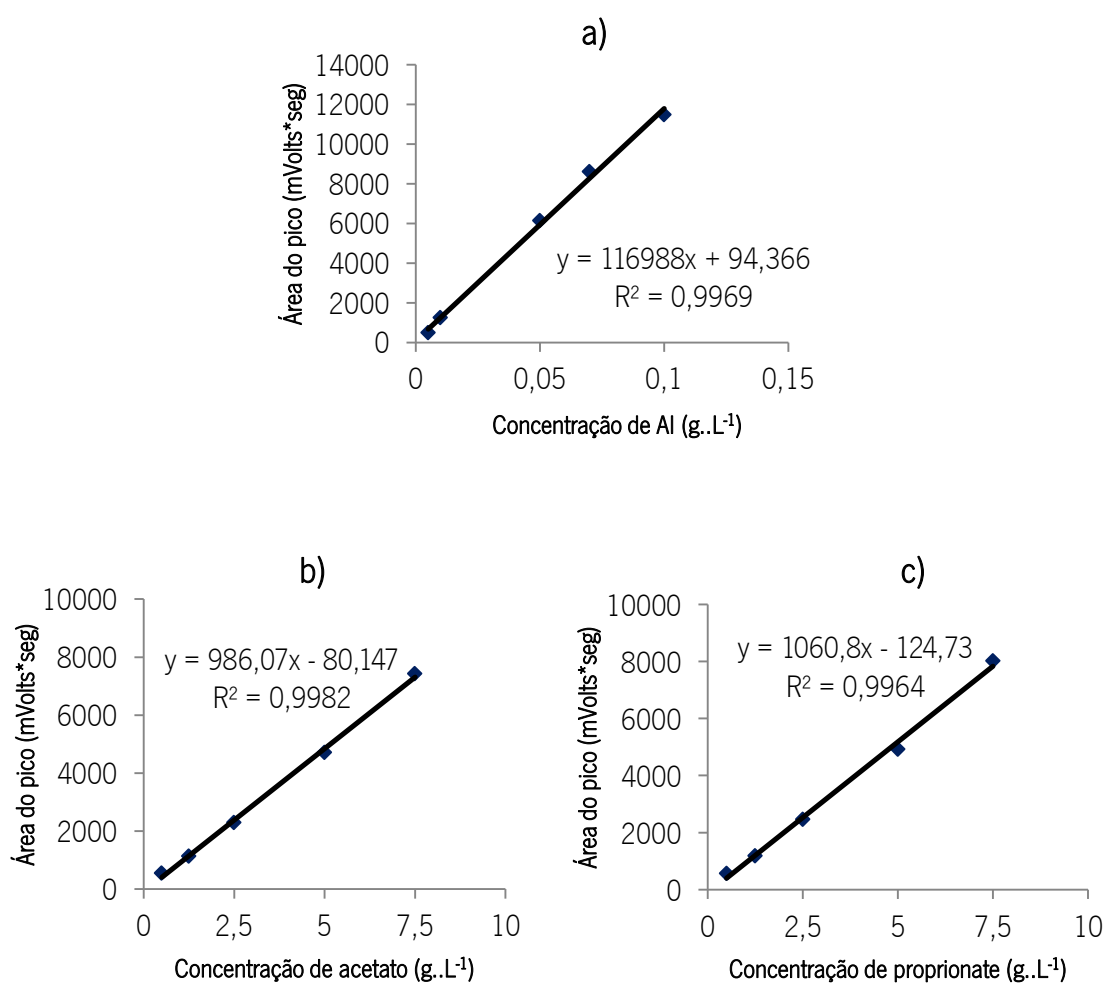


Figura A.3 - Expressão das retas de calibração do HPLC, para cada composto analisado. a) Ácido Itacônico; b) Acetato; c) Propionate.

A.2. Instalação experimental em biorreator

As experiências 2 e 3, descritas anteriormente, foram realizadas num Biorreator (BIOSTAT[®] B-DCU II).

A Figura A.4. mostra uma fotografia da instalação experimental utilizada nestas experiências.

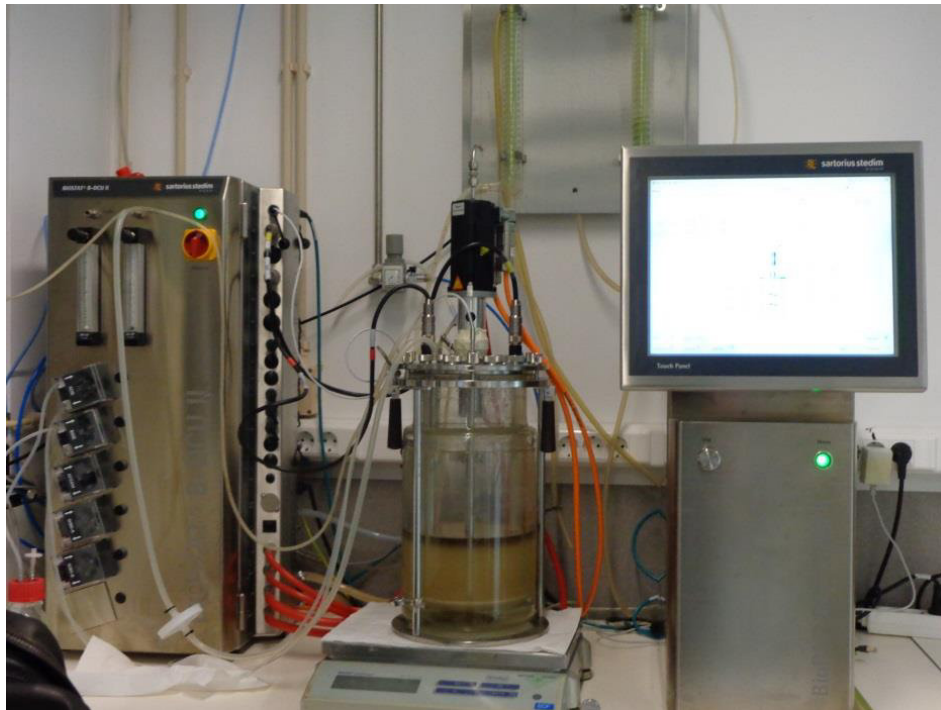


Figura A.4 - Fotografia da instalação experimental do biorreator.

A.3. Dados utilizados ao longo do trabalho

A.3.1. Curvas de crescimento referente à experiência 1

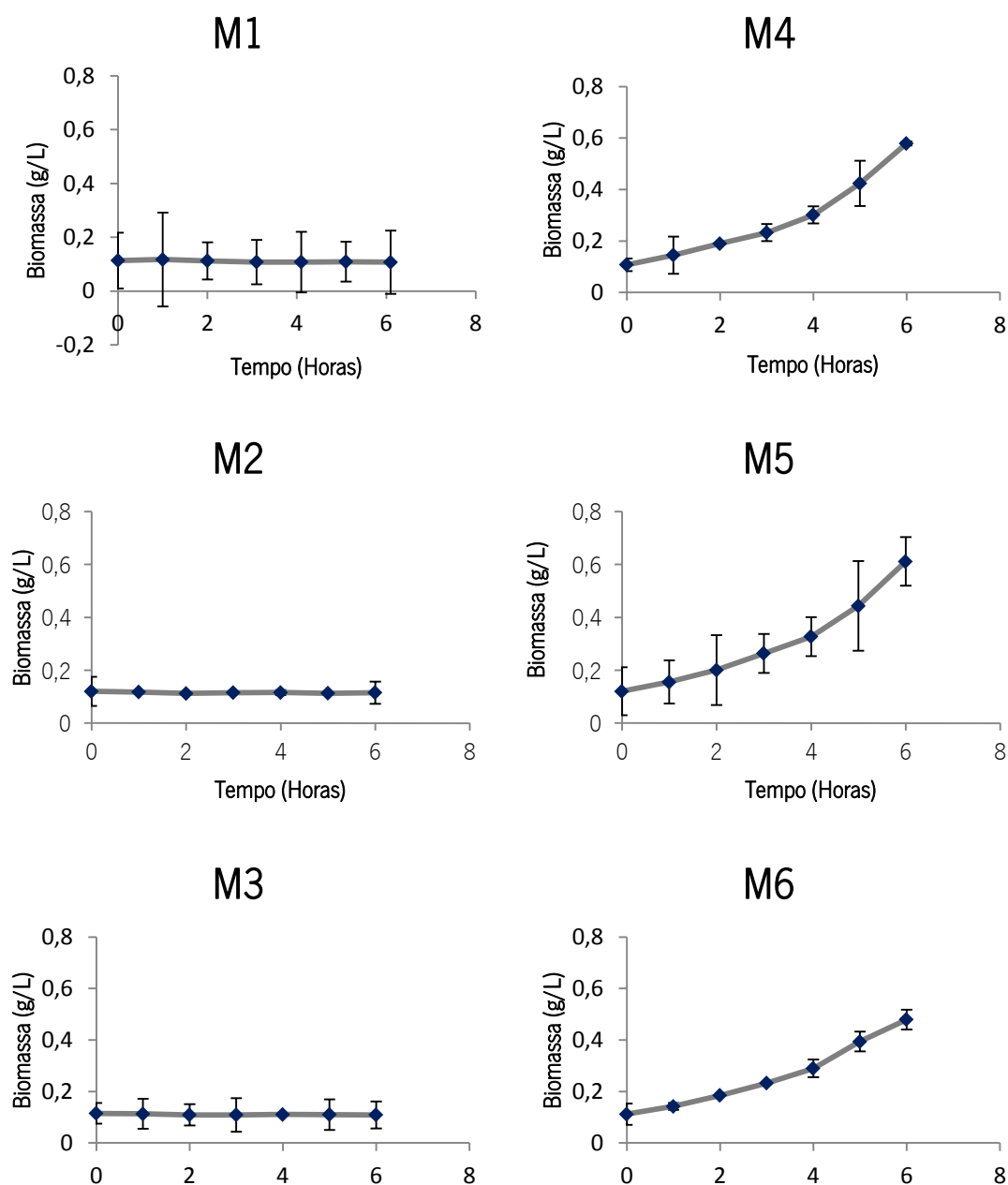


Figura A.5 - Curvas de crescimento e respetivos erros padrão. **M1** (Meio M9+ 0 g.L⁻¹ Al), **M2** (Meio M9 + 0,1 g.L⁻¹ Al), **M3** (Meio M9 + 1g.L⁻¹ Al), **M4** (Meio M9 + 0g.L⁻¹ Al + glucose), **M5** (Meio M9 + 0,1g.L⁻¹ Al + glucose) e **M6** (Meio M9 + 1g.L⁻¹ Al + glucose).

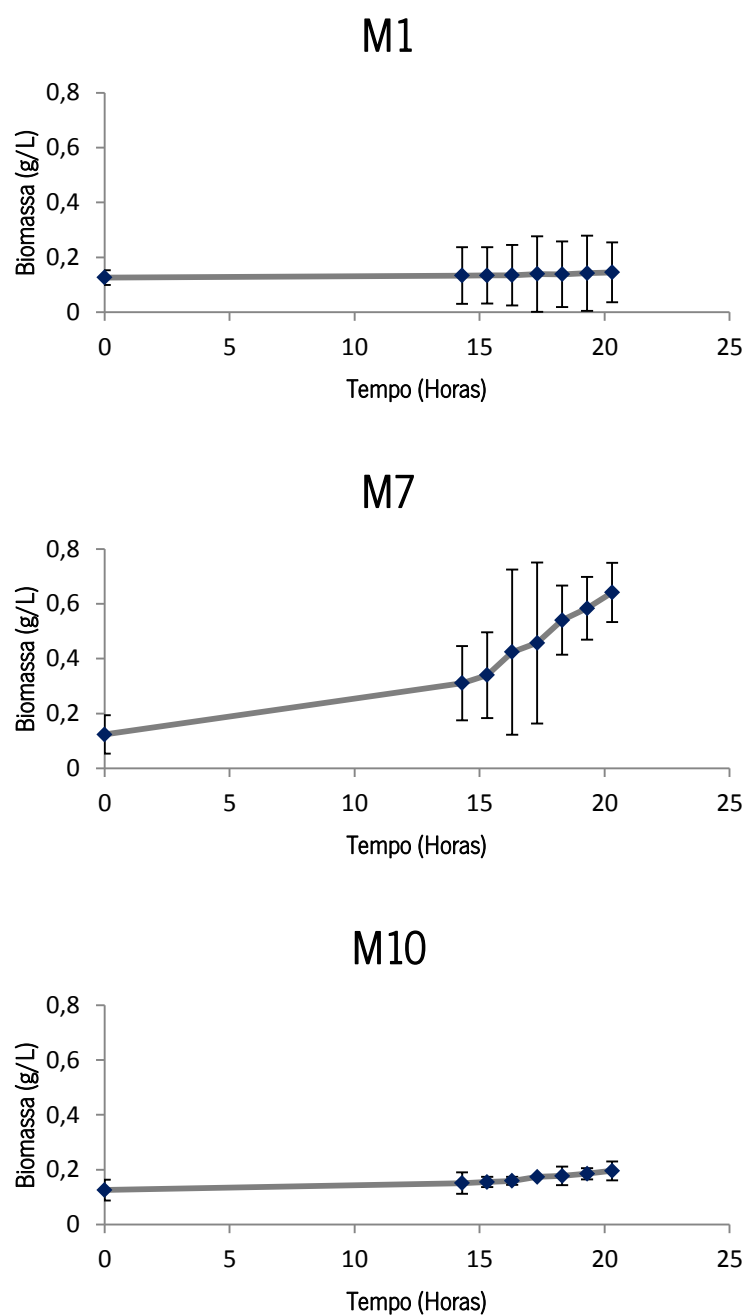


Figura A.6 – Curvas de crescimento e respetivos erros padrão. **M1** (Meio M9 + 0 g.L⁻¹ Al), **M7** (Meio M9 + 0 g.L⁻¹ Al + acetato) e **M10** (Meio M9 + 0g.L⁻¹ Al + proprionato)

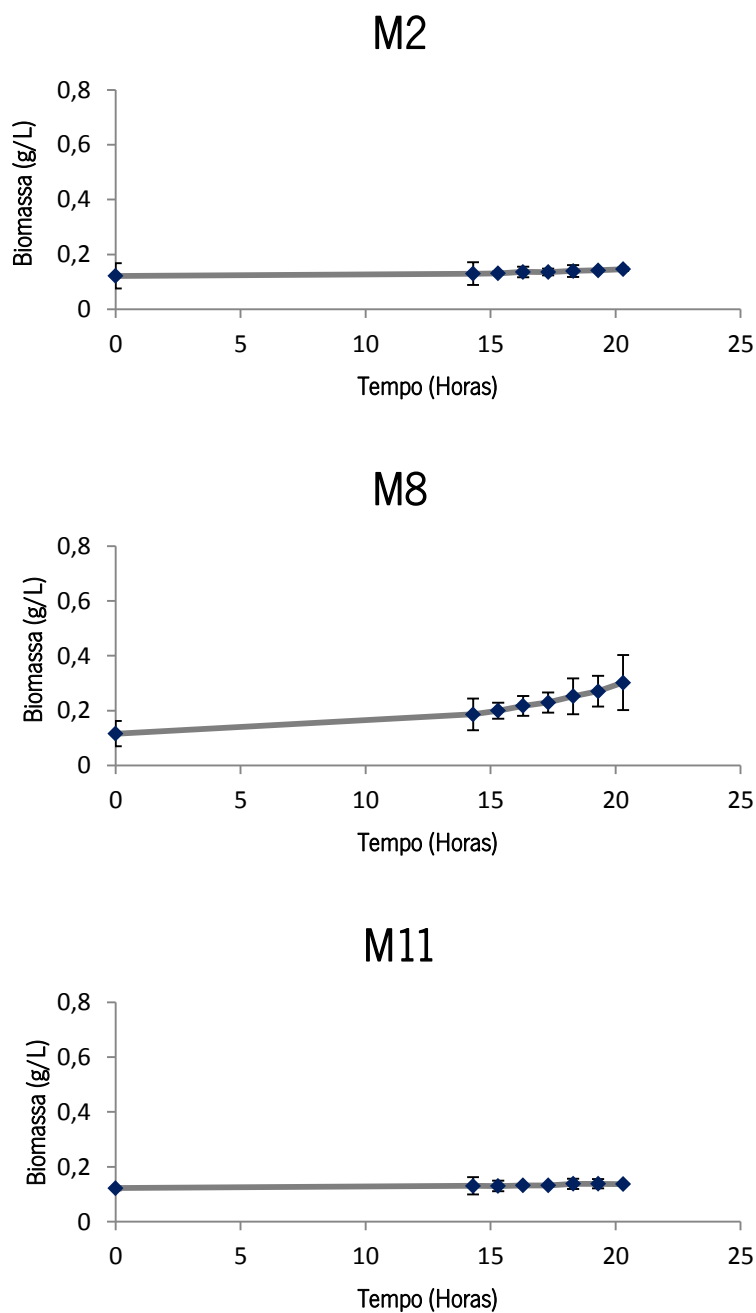


Figura A.7- Curvas de crescimento e respetivos erros padrão. **M2** (Meio M9 + 0,1 g.L⁻¹ Al), **M8** (Meio M9 + 0,1 g.L⁻¹ Al + acetato) e **M11** (Meio M9 + 0,1 g.L⁻¹ Al + propionato)

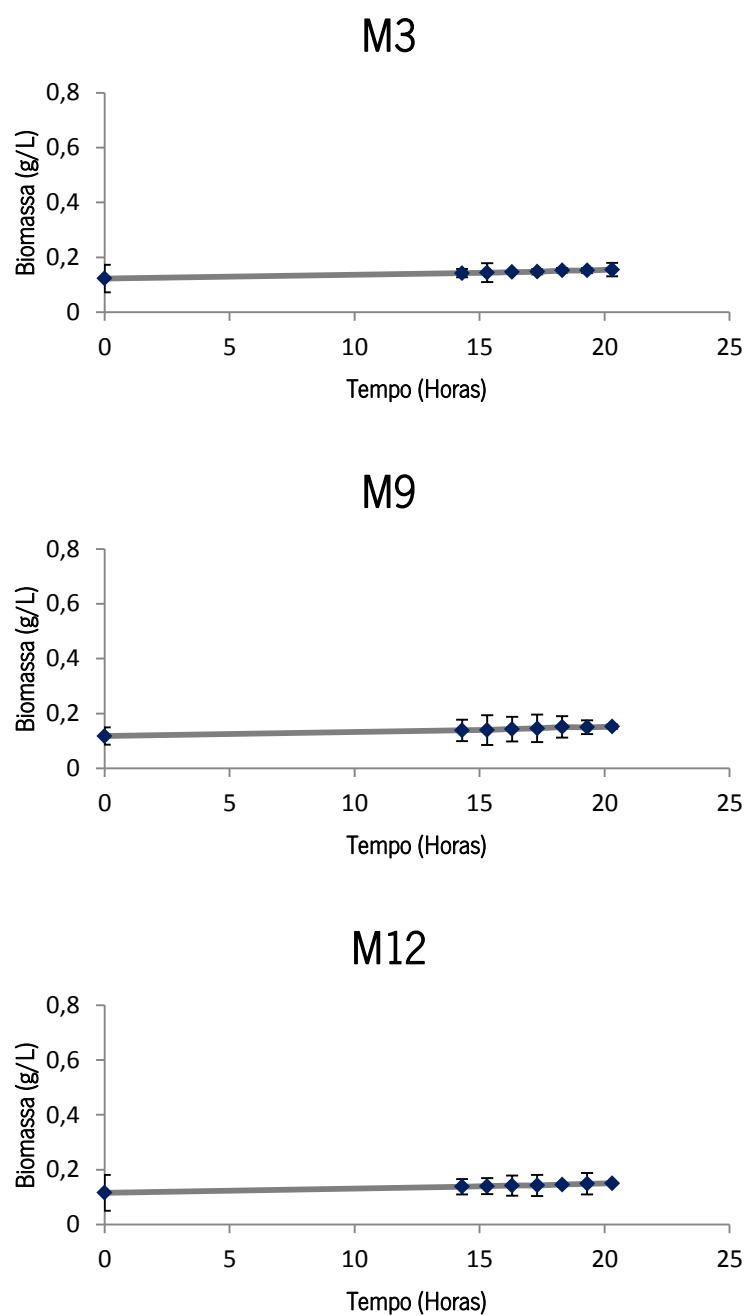


Figura A.8 - Curvas de crescimento e respetivos erros padrão. **M3** (Meio M9 + 1 g.L⁻¹ Al), **M9** (Meio M9 + 1 g.L⁻¹ Al + acetato) e **M12** (Meio M9 + 1g.L⁻¹ Al + proprionato)

A.3.1.1. Concentração de substrato

Para a obtenção de alguns resultados referentes ao efeito do AI no meio de cultura de *E. coli* W3110, em matraz, foram calculados os consumos dos respectivos substratos ao longo do tempo.

Nas Tabelas A.1, A.2 e A.3, estão representadas as respectivas concentrações de substrato iniciais e finais, resultados que foram utilizados para determinar alguns parâmetros descritos em 3.1 (μ e $Y_{x/s}$).

Tabela A.1 - Resultados experimentais na fermentação em glucose.

		M1	M2	M3	M4	M5	M6
Glucose (g L ⁻¹)	Inicial	-	-	-	3,790 ± 0,030	4,030 ± 0,213	3,970 ± 0,095
	Final	-	-	-	2,370 ± 0,043	2,450 ± 0,313	2,600 ± 0,343
Itacônico (g L ⁻¹)	Inicial	-	0,100 ± 0,001	0,950 ± 0,114	-	0,110 ± 0,002	0,980 ± 0,135
	Final	-	0,090 ± 0,011	1,040 ± 0,156	-	0,100 ± 0,007	1,00 ± 0,120

(-) não contém estes substratos

Tabela A.2 - Resultados experimentais na fermentação em acetato.

		M1	M2	M3	M7	M8	M9
Acetato (g L ⁻¹)	Inicial	-	-	-	1,790 ± 0,103	1,940 ± 0,086	1,810 ± 0,021
	Final	-	-	-	0,340 ± 0,148	1,510 ± 0,345	1,810 ± 0,032
Itacônico (g L ⁻¹)	Inicial	-	0,100 ± 0,001	0,950 ± 0,114	-	0,100 ± 0,002	0,910 ± 0,011
	Final	-	0,090 ± 0,011	1,040 ± 0,156	-	0,130 ± 0,004	1,100 ± 0,062

(-) não contém estes substratos

Tabela A.3 - Resultados experimentais na fermentação em propionato.

		M1	M2	M3	M10	M11	M12
Propionato (g L ⁻¹)	Inicial	-	-	-	1,72 ± 0,052	1,94 ± 0,246	1,90 ± 0,127
	Final	-	-	-	1,93 ± 0,268	2,32 ± 0,135	2,27 ± 0,159
Itacônico (g L ⁻¹)	Inicial	-	0,100 ± 0,001	0,950 ± 0,114	-	0,10 ± 0,0002	0,92 ± 0,014
	Final	-	0,090 ± 0,011	1,040 ± 0,156	-	0,12 ± 0,007	1,15 ± 0,018

(-) não contém estes substratos

A.3.2. Acumulação de subprodutos referente à experiência 2

Além da análise de parâmetros fisiológicos, para perceber o efeito de Al no metabolismo de *E.coli*, foram analisadas amostras em GC-MS, de modo a quantificar metabolitos extracelulares.

Na Figura A.5. estão representadas as concentrações de citrato e succinato ao longo do tempo, resultados que foram utilizados para discutir a acumulação destes compostos antes e após adição do Al (na secção 3.1).

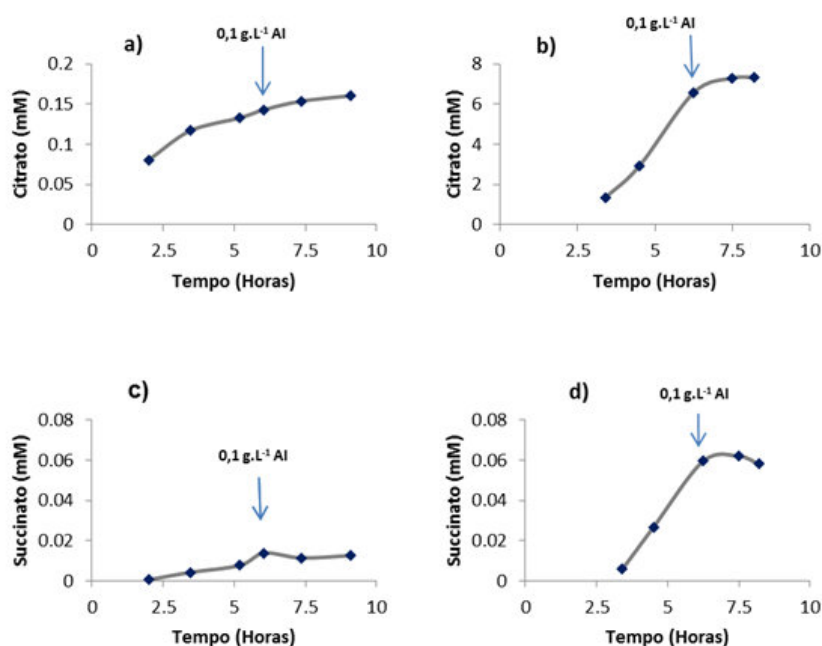


Figura A.9 - Quantificação por GC-MS, de citrato e succinato ao longo do tempo, nas culturas aeróbicas em modo *Fed-Batch*. a) e c) Glucose como fonte de carbono; b) e d) Acetato como fonte de carbono.